

REINIGUNG UND PHYSIKOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG
DES C3b-INAKTIVATORS (C3b INA)
AUS MEERSCHWEINCHENSERUM

ULF GÖBEL

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555607_0090

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

REINIGUNG UND PHYSIKOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG
DES C3b-INAKTIVATORS (C3b INA) AUS MEERSCHWEINCHENSERUM

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Ulf Göbel

aus Koblenz

Mainz 1976

Fachbereichsdekan: Prof. Dr. P. Klein
1. Gutachter: Prof. Dr. D. Bitter-Suermann
2. Gutachter: Prof. Dr. M. Loos
Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.1976

Gesamtherstellung



DITTERS BÜRODIENST
6501 HEIDESHEIM/RHEIN
AM KAPELLCHEN 1 • RUF 0 6132/57 11



Inhaltsverzeichnis

	Seite
A) EINLEITUNG	1
1. Klassische Aktivierung	1
2. Nebenschlußaktivierung	1
3. Biologische Leistungen	3
4. Physiologische Kontrolle des C-Systems	5
B) AUFGABENSTELLUNG	13
C) MATERIAL und METHODEN	14
1. Chemikalien, Chromatographie-Material, Puffer	14
a) Chemikalien	14
b) Chromatographie-Materialien	16
c) Puffer	16
2. Testreagentien und Zell-Komplement Intermediär- produkte	18
a) Testreagentien	18
b) Zellen und Zell-Komplement Intermediärprodukte	19
c) Testsysteme für C3 und C3b INA	21
d) Proteinbestimmung	22
3. Reinigung des C3b INA aus Meerschweinchenserum	23
a) Erstes Reinigungsverfahren	23
b) Zweites Reinigungsverfahren	28
4. Gewinnung des Antiserums	30
a) Immunisierung	30
b) Herstellung eines Anti-C3b INA - IgG-Präparates	31

	Seite
c) Kopplung des Anti-C3b INA - IgG an Sepharose 4B-CN Br	32
5. Reinheitsnachweis	32
a) Immunelektrophorese	32
b) Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony	33
c) Analytische Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAA)	33
d) SDS-Gelelektrophorese	35
6. Physikochemische Untersuchungen	35
a) Bestimmung des Molekulargewichts	35
b) Sedimentationskonstante	37
c) Isoelektrischer Punkt	39
D) ERGEBNISSE	40
1. Reinigung des C3b INA aus Meerschweinchenserum	40
2. Gewinnung eines monospezifischen Antiserums gegen C3b INA	44
3. Reinheitsnachweis	44
4. Physikochemische Charakterisierung des C3b INA	52
E) DISKUSSION	60
F) ZUSAMMENFASSUNG	64
G) LITERATURVERZEICHNIS	65

A) EINLEITUNG

Das Komplementsystem (42,44,45,78,105) besteht aus einer Reihe von neun Serumproteinen, die gemäß ihrer Entdeckung mit C'1 - C'9 bezeichnet werden (87). Die einzelnen Faktoren reagieren in einer strengen Reihenfolge miteinander, die nicht mit der numerischen Reihenfolge identisch ist. C1 - C4 - C2 - C3 - C5 - C6 - C7 - C8 - C9.

Innerhalb dieser Sequenz ist die Position der Einzelkomponente nicht austauschbar.

Die Aktivierung dieses Systems kann auf zwei Wegen erfolgen:

1. Klassische Aktivierung

Die klassische Aktivierung erfolgt über die Komponenten C1, C4 und C2. Die erste Komponente liegt im Serum als Makromolekül vor und besteht aus den Untereinheiten C1q, C1r und C1s.

Durch Bindung von C1q an das Fc-Stück von IgG oder IgM, das in Immunkomplexen vorliegt (16), kommt es zur Aktivierung von C1r und C1s. Dieser Schritt ist Ca^{++} abhängig (78,105).

Substrat des aktivierten C1 ist die Komponente C4, die in zwei Fragmente C4a und C4b gespalten wird. An das größere Fragment C4b wird C2 angelagert und ebenfalls durch die C1-Esterase in die Bruchstücke C2a und C2b gespalten. Mg^{++} abhängig bildet sich nun durch Komplexierung von C4b und C2a die klassische C3-Konvertase, das C4_2 -Enzym (77).

2. Nebenschlußaktivierung

Der zweite Weg, der sehr viel später aufgeklärt wurde, führt unter Umgehung der ersten drei Komponenten des klassischen

Weges zur Aktivierung von C3 (11,45,78). Diese Aktivierung erfolgt unabhängig von Antigen-Antikörperkomplexen (Ag - Ak Kompl.). Daher auch die Bezeichnung Nebenschlußaktivierung, englisch "alternative pathway".

Ein anderes Synonym ist Properdinsystem (91,92). Dieses System besteht aus mehreren Faktoren. Sicher nachgewiesen sind ein sogenannter Initialfaktor (73), dann das eigentliche Properdin, schließlich die Faktoren B und D. Die Aktivierung dieses Systems ist Mg^{++} abhängig und kann durch eine Reihe verschiedener Substanzen eingeleitet werden. Solche Induktoren sind beispielsweise Polyanionen wie Dextransulfat (13,17,43), Zellwandbestandteile von Hefezellen wie Zymosan (18,82) und die Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterienzellwände (Endotoxine) (25,62,74), ferner Pneumokokkenpolysaccharide und Levan aus Corynebakterien (13,124). Auch ein VF (= venom factor) genannter Bestandteil des Cobratoxins (12,18) oder F(ab)₂-Fragmente z.B. von IgA (40) und Meeresschweinchen γ 1 Antikörpern (55) können dieses System aktivieren.

Es kommt zur Bildung eines Enzyms, das - ebenso wie die klassische C3-Konvertase - C3 in die Bruchstücke C3a und C3b spaltet. Das kleinere Fragment C3a hat anaphytoxische und chemotaktische Wirkung (14,19). Das größere Bruchstück C3b greift einmal, zusammen mit den Faktoren des Properdinsystems, in einen positiven Feedbackzirkel ein, der zu einer weiteren Spaltung von C3 führt; zum anderen läuft über C3b die Sequenz der terminalen Faktoren C5 - C9 ab (58).

Die Reaktionen der letzten Komponenten C6 - C9 sind erst in

der allerletzten Zeit sicher analysiert worden. Ein wesentlicher Unterschied zum Beginn der Sequenz besteht in folgendem: Bis zur Spaltung der fünften Komponente C5 in C5a und C5b handelt es sich um enzymatische Reaktionen, in deren Verlauf die nativen Faktoren in verschiedene Bruchstücke mit jeweils unterschiedlichen Funktionen gespalten werden. Ganz im Gegensatz dazu besteht die Reaktion der terminalen Sequenz in einer Komplexierung der Einzelkomponenten C5b - C9 miteinander (56,56a,58). Spaltstücke wurden bis heute noch nicht nachgewiesen (58,84,85).

3. Biologische Leistungen

Die biologischen Leistungen des Komplementsystems lassen sich mit drei Stichworten umreißen: Entzündungsvermittlung, Erregerabwehr und Regulation der Funktion von Zellen des Immunsystems. Als Entzündungsvermittler wirken in erster Linie die kleineren Bruchstücke der Komponenten C3 und C5, C3a und C5a; C5a ist das klassische Anaphylatoxin. Beide bewirken eine Steigerung der Vasopermeabilität und eine Histaminfreisetzung. Sowohl C3a als auch C5a wirken darüber hinaus chemotaktisch. Als Leukotaxine führen sie zu einer verstärkten Einwanderung von Leukozyten in das entzündlich veränderte Gewebe. Der Durchtritt der Leukozyten aus dem Gefäßlumen wird durch die histaminbedingte Auflockerung der Gefäßwand erleichtert (14,19,33,118, 125).

Kontrolliert wird die Aktivität der beiden Peptide C3a und C5a durch eine im Serum vorkommende Carboxypeptidase-B, den Anaphylatoxin-Inaktivator (14).

Ein weiterer ebenfalls von C3 abstammender Faktor soll darüber hinaus eine vermehrte Ausschwemmung reifer Granulozyten aus dem Knochenmark bewirken (99).

Bei der Erregerabwehr ließen sich die folgenden Phänomene experimentell sichern: Virusneutralisation, Opsonisierung mit anschließender Phagozytose, Zytolyse, speziell Bakteriolyse.

Die Virusneutralisation entsteht durch Auflagerung von Ak und C1, C2, C4 oder C3 auf die Virusoberfläche. Durch diesen Überzug mit körpereigenem Protein wird die Aufnahme des Viruspartikels in die Wirtszelle unmöglich (22).

Unter Komplement-abhängiger Opsonisierung versteht man den Besatz von Ag-Ak Komplexen mit C3b. C3b wird an entsprechende Rezeptoren von Makrophagen gebunden, was zu einer Phagozytosesteigerung führt (47,109).

Bei der Bakteriolyse kommt es durch Komplementeinwirkung auf Ak-beladene Bakterien in Gegenwart von Lysozym zu einer Zerstörung der Bakterienmembran (23,37).

Ein Sonderfall der Immunzytolyse ist die Immunhämolyse. Hier werden Ak-beladene (= sensibilisierte) Hammelerythrozyten (EA) infolge einer irreversiblen Membranläsion, hervorgerufen durch C8 und C9, zerstört (39,56).

Daneben kommt dem Komplementsystem auch eine bedeutende Rolle bei der unspezifischen, d.h. Ak unabhängigen, Erregerabwehr zu. Dies gilt insbesondere für die Präimmunphase oder den Ak-Mangel, da das C-System - wie oben beschrieben - über die Nebenschlußreaktion unabhängig von Ag-Ak Komplexen aktiviert werden kann.

Besonders erwähnenswert ist das Vorkommen von C3b-Rezeptoren an B-Lymphozyten und Makrophagen. Diskutiert wird eine Hilfe bei der Zellkooperation (30,75) und Funktion der Zellen des Immunsystems (46,106,111,119). Unterstützt wurden diese Befunde durch neuere Versuche in denen es gelang, nach Besatz von B-Lymphozyten mit C3b einen gesteigerten Thymidineinbau nachzuweisen (46).

4. Physiologische Kontrolle des C-Systems

Nach dem oben Gesagten ist es verständlich, daß ein derart reagibles und wirksames System, vergleichbar mit dem Gerinnungssystem, einer äußerst genauen biologischen Kontrolle unterliegen muß (35,45,100).

Gewährleistet wird die biologische Regulation durch mehrere Inaktivatoren. Inhibiert bzw. inaktiviert werden jeweils nur die aktivierten Komponenten. Man kennt einen C1- (61, 65-69,90,94), C4- (21,50), C3- (57,101-104,114,116) und C6- (114) Inaktivator. Daneben existiert der oben genannte Anaphylatoxininaktivator (14).

Ein C2-Zerfallsbeschleuniger ist beschrieben worden (48,49, 88).

Bei dem C1-Inaktivator handelt es sich um ein in Leberparenchymzellen synthetisiertes α -Globulin. Er wurde beim Menschen (61), beim Kaninchen und beim Meerschweinchen (65) beschrieben und isoliert. Die C1-Esterase wird durch ihn kompetitiv gehemmt. Sein Fehlen führt zu dem Bild des hereditären angioneurotischen Ödems (27). Als weitere Besonderheit ist zu erwähnen, daß der C1-Inaktivator nicht nur auf C1, sondern auch

auf Plasmin, Kallikrein und andere Enzyme hemmend wirkt (9,34,52,95).

Der von Cooper beschriebene C4-Inaktivator ist wahrscheinlich mit dem C3b-Inaktivator identisch (21).

Der sogenannte C2-Zerfallsbeschleuniger wurde aus den Stromata humaner Erythrozyten isoliert. Er bewirkt den raschen Zerfall von membrangebundenem, aktivierten C2 und soll verantwortlich sein für die schlechte Lysierbarkeit menschlicher Erythrozyten durch Komplement. Bei der Reaktion wird er verbraucht. Ein ähnlich wirkender Faktor wurde auch aus Human- und Meerschweinchenserum isoliert. Fraglich ist jedoch, ob ein Zusammenhang zwischen Serum- und Stromafaktor besteht (48,49,88).

Über den C6-Inaktivator ist nur sehr wenig bekannt. Er wurde im Human-, Kaninchen- und Meerschweinchenserum nachgewiesen. Seine Sedimentationskonstante beträgt 6,4 S. Auch er ist nur gegen zellgebundenes C6 wirksam (114).

Bevor nun auf den C3b-Inaktivator (C3b INA) eingegangen wird, soll die Bedeutung seines Substrates C3b hervorgehoben werden:

Die Komponente C3 nimmt innerhalb des Komplementsystems in mehrfacher Hinsicht eine Sonderstellung ein: Erstens liegt diese Komponente in einer um ein mehrfaches höheren Serumkonzentration vor als andere Komplementfaktoren (45,108). Zweitens kann C3 auf drei verschiedenen Wegen gespalten werden, nämlich über die klassische Sequenz, das Properdinsystem und schließlich unspezifisch durch Proteasen wie

Trypsin. In jedem Fall entsteht neben C3a auch C3b, das Substrat des C3b INA. Drittens erfüllen die bei diesen Reaktionen entstehenden Fragmente, so auch C3b, wichtige biologische Funktionen (s. Abb. 1).

So liefert C3b den Bindungsort für C5 und ermöglicht damit die Reaktion der terminalen Sequenz, d.h. wird C3b eliminiert, ist der vollständige Ablauf der Komplementsequenz unmöglich, somit kann z.B. die Immnhämolyse nicht stattfinden. Des weiteren greift C3b, wie oben beschrieben, in einen positiven Feedbackzyklus ein, der zu einer lawinenartigen weiteren C3-Spaltung führt.

Zuletzt erfüllt C3b über Anlagerung an die entsprechenden Rezeptoren verschiedener Zellsysteme weitere wichtige biologische Funktionen (Abb.1):

Die Anlagerung C3b beladener (opsonisierter) Immunkomplexe an Makrophagen bewirkt eine Phagozytosesteigerung. Lagern sich solche Immunkomplexe an die C3b-Rezeptoren von Erythrozyten oder Thrombozyten an, so spricht man von Immunadhärenz (81, 86). Reagieren C3b-Moleküle mit Rezeptoren an B-Lymphozyten, so soll daraus eine Regulation der B-Zellfunktion resultieren (46,106,111). Andere Autoren sprechen dem C3b nur eine unterstützende Verstärkerfunktion bei der Antigenerkennung auf der B-Zellebene zu (30,75). Angesichts der Bedeutung der dritten Komplementkomponente innerhalb des C-Systems ist es verständlich, daß dem C3b INA innerhalb der biologischen Regulation dieses Systems eine zentrale Bedeutung zukommt.

Der C3b INA spaltet das nach der Aktivierung von C3 entstehende C3b. Bei dieser Reaktion, bei der C3b sowohl in der

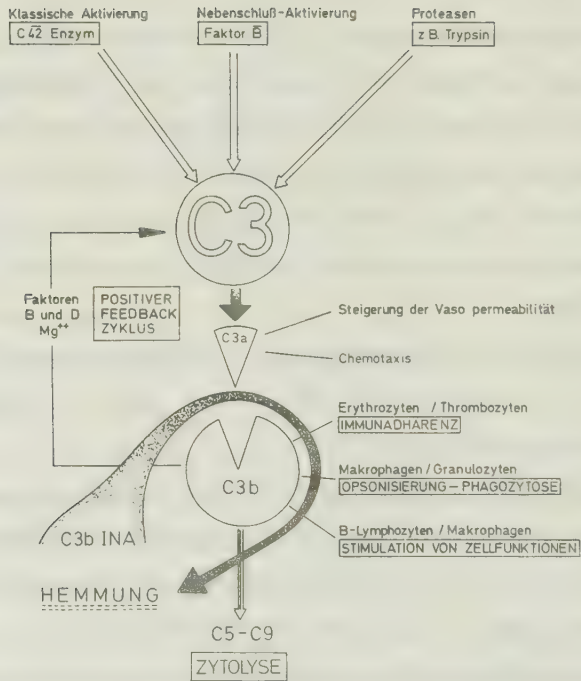


Abb. 1: Aktivierungsmöglichkeiten sowie biologische Funktionen von C3 und ihre Hemmung durch den C3b INA.

flüssigen Phase (36,103) als auch zellgebunden (57,59, 101-103,114) vorliegen kann, entstehen zwei Bruchstücke, ein größeres C3c und ein kleineres Fragment C3d. Zur Verdeutlichung die folgende Abbildung, die den Aufbau des C3-Moleküls zeigt (Abb.2):

Das C3-Molekül besteht aus zwei durch Disulfidbrücken und nichtkovalente Bindungen zusammengehaltenen Ketten, einer α -Kette mit einem Molekulargewicht von 120.000 und einer β -Kette mit einem Molekulargewicht von 75.000. Durch Einwirkung der C3-Konvertase wird vom N-terminalen Ende der α -Kette ein Peptid mit einem Molekulargewicht von ca. 9.000 abgespalten. Das verbleibende größere Fragment ist das C3b, das Substrat des C3b INA. Der C3b INA greift ebenfalls am N-terminalen Ende der α -Kette an (15).

Es entstehen ein ca. 25.000 Dalton großes Bruchstück, das C3d, welches im Falle des zellgebundenen C3b an der Membran verbleibt, und das C3c-Molekül mit einem Molekulargewicht von 140.000, das im oben genannten Fall in den Überstand abgegeben wird. Diese Reaktion ist insbesondere im Hinblick auf den positiven Feedbackmechanismus von Bedeutung, da durch die C3b-Spaltung eine überschießende C3-Aktivierung durch eine unkontrollierte positive Rückkopplung verhindert wird (1,4,60). Diese Situation liegt bei einem Mangel des C3b INA vor (1-6) und führt zu einem starken Absinken des C3-Serumspiegels, da die C3-Produktion mit dem raschen Verbrauch nicht Schritt halten kann. Das klinische Bild des C3b INA-Mangels ist gekennzeichnet durch eine gesteigerte Infektanfälligkeit, die nur durch ständige C3-Substitution therapiert werden kann (1-6).

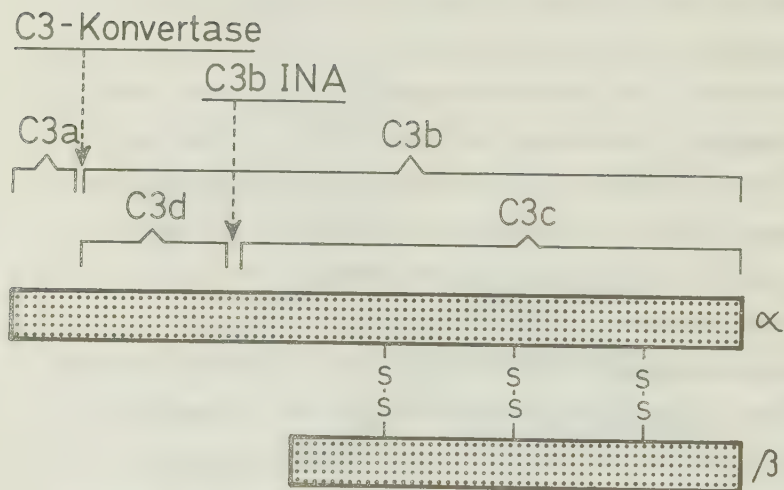


Abb. 2: Modell des humanen C3 Moleküls mit den Angriffsorten der C3 Konvertase und des C3b INA (modifiziert nach 15).

Alle biologischen Effekte, die durch C3b hervorgerufen werden wie z.B. die Immunnäolyse und Immunadhärenz, können nach den vorausgegangenen Eriäuterungen durch den C3b INA unterbunden werden. Der Verlust der hämolytischen Eigenschaft und der Immunadhärenz von EAC 1423 Zellen bildet die experimentelle Grundlage der C3b INA-Testung (s. Methodenteil). Erstmals beschrieben von Tamura und Nelson für Human-, Kaninchen- und Meerschweinchenserum (114) wurde der humane C3b INA in der Folge eingehend untersucht. Er ist identisch mit dem von Lachmann beschriebenen KAF = konglutinogen activating factor (57). Dessen Wirkung beruht auf Freilegung von C3d, an das sich Konglutinin, ein aus Rinder Serum gewonnenes Protein, anlagern kann (57).

Die bisherigen Ergebnisse für den humanen C3b INA sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Für den Meerschweincheninaktivator liegt bis heute kein Reinigungsschema vor und außer der Sedimentationskonstante 5S (114) finden sich in der Literatur keine Angaben über seine physikochemischen Parameter.

Tabelle 1

Eigenschaften des humanen C3b INA

1) Physikochemische Parameter

Molekulargewicht	ca. 100.000	(57)
Sedimentationskonstante	4,9 S	(101)
	5,1 S	(116)
	5,5 - 6,0 S	(57)
Diffusionskoeffizient	$5 \times 10 \text{ cm}^2/\text{sec}$	(57)
Elektrophoretische Wanderung	β -Globulin	(57,101,116)
		(57,101)
Hitzestabilität	30° 56°	
Aktivitätsverlust durch	Mercaptoäthanol	(101)
	Kalium-metaperjodat	(101)
kein Aktivitätsverlust	Hydrazin	(57)
	Jod	(57)
	Jodacetamid	(57)
	Dithionit	(57)
	DFP (Diisopropyl-fluorophosphat)	(57,101)
	NEM (N-äthylmaleimid)	(101)
	Trypsin-Inhibitor	(57,101)
	C1-Inhibitor	(57)

2) Substrate

C3b zellgebunden/
Flüssigphase (36,57,59,101-103,114)

3) Reaktionsmechanismus

enzymatisch (36,57,101)

B) AUFGABENSTELLUNG

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es daher, den C3b-Inaktivator aus Meerschweinchenserum zu isolieren, rein darzustellen und seine physikochemischen Parameter zu bestimmen. Darüber hinaus sollte ein monospezifisches Antiserum gegen dieses Protein hergestellt werden.

C) MATERIAL und METHODEN

1. Chemikalien, Chromatographie-Material, Puffer

a) An Chemikalien wurden bezogen:

Acrylamid	(Serva, Heidelberg)
Agarose	(Biomol, Ivversen)
Äthanol	(Merck, Darmstadt)
Äthylendiamin	(Merck, Darmstadt)
Äthylendiamintetraacetat- Tetranatriumsalz (EDTA)	(Roth, Karlsruhe)
Albumin aus Rinderserum	(Boehringer, Mannheim)
Ambozeptor	(Behringwerke, Marburg/Lahn)
Amidoschwarz 10 B Extra	(Serva, Heidelberg)
Ammoniumpersulfat	(Merck, Darmstadt)
Antibodies against sheep red cells IgG	(Cordis Laboratories Miami, Florida, USA)
Anti-Meerschweinchen- serum vom Kaninchen	(Behringwerke, Marburg/Lahn)
Blue Dextran 2000	(Pharmacia Uppsala, Schweden)
Bromthymolblau Na-Salz	(Merck, Darmstadt)
Chymotrypsinogen	(Boehringer, Mannheim)
Coomasie Brilliant Blau R 250	(Serva, Heidelberg)
Cytochrom C	(Boehringer, Mannheim)
Dikaliumhydrogenphosphat wasserfrei	(Merck, Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat 2-hydrat	(Merck, Darmstadt)
Dithiothreitol	(Roth, Karlsruhe)
Elektrophoresepuffer pH 8.6	(Merck, Darmstadt)

Essigsäure 100 %	(Merck, Darmstadt)
Freund Adjuvans, komplett	(Difco Laboratories, Detroit, USA)
Gelatine	(Merck, Darmstadt)
Glucose	(Merck, Darmstadt)
Glycerin	(Merck, Darmstadt)
Glycerin	(Serva, Heidelberg)
Hydrazinhydroxid	(Merck, Darmstadt)
2-Jodacetamid	(Merck, Schuchardt, München)
Kaliumdihydrogenphosphat	(Merck, Darmstadt)
Kaliumhexacyanoferrat III	(Serva, Heidelberg)
Katalase aus Rinderleber	(Boehringer, Mannheim)
Methanol	(Merck, Darmstadt)
2-Mercaptoäthanol	(Fluka AG, Buchs, SG, Schweiz)
Natriumazid	(Merck, Darmstadt)
Natrium-5,5-diäthylbarbitursäure	(Merck, Darmstadt)
Natriumhydrogenphosphat	(Merck, Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat	(Merck, Darmstadt)
Natriumpersulfat	(Merck, Darmstadt)
N,N-Methylenbisacrylamid	(Serva, Heidelberg)
N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin	(Serva, Heidelberg)
Perhydrol	(Merck, Darmstadt)
Pure Toxin (Pure snake venom) (naja naja)	(Miami, Serpentarium Laboratories, Miami, Florida, USA)
RNA-Polymerase	(Boehringer, Mannheim)
Saccharose reinst	(Merck, Darmstadt)
Schwefelsäure 95-97 %	(Merck, Darmstadt)

Servalyt Trägerampholyte	
pH 3-10, 6-8 40 %	(Serva, Heidelberg)
Silikon	(Serva, Heidelberg)
Trichloressigsäure	(Merck, Darmstadt)
Tris (hydroxy methyl)aminomethan	(Merck, Darmstadt)
Titriplex III 8418	(Merck, Darmstadt)
Titrisol 1N HCl	(Merck, Darmstadt)
Titrisol 1N NaOH	(Merck, Darmstadt)
Trypsininhibitor aus Sojabohnen	(Merck, Darmstadt)

b) Chromatographie-Materialien

Biogel P-300 100-200 mesh	(Biorad Laboratories Richmond, California, USA)
Carboxymethyl-Cellulose CM 52	(Whatmann, Balstone, Maidstone, England)
CaOH-Apatit	(selbst hergestellt, (10))
Diäthylaminoäthyl-Cellulose DE 52	(Whatmann, Balstone, Maidstone, England)
Sephadex G 200 superfine	(Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Sepharose- 4 B CN Br	(Pharmacia, Uppsala, Schweden)

c) Puffer

Die genaue Zusammensetzung der bei der Chromatographie verwendeten Puffer wird bei der Beschreibung der einzelnen Reinigungsvorschriften genannt.

Es handelte sich um niedermolare Kalium- oder Natriumphosphat- bzw. Tris-Puffer, deren Leitfähigkeit durch Zugabe von NaCl auf den gewünschten Wert eingestellt wurde. Die Leitfähigkeit wird ausgedrückt in Millisiemens (mS) gemessen bei 20°C (0,01 M NaCl = 1 mS) mit einem Gerät der Firma Radiometer (Kopenhagen).

Veronalpuffer (VPS)

Isotoner Veronalkochsalzpuffer (pH 7,5 und 15 mS) nach

Mayer (51). Ansatz der konzentrierten Stammlösung:

83,0 g NaCl und 10,19 g Na-5,5-diäthylbarbitursäure wurden in 1500 ml H_2O gelöst und mit 34,58 ml 1 N HCl auf pH 7,3 - 7,4 eingestellt und ad 2000 ml mit H_2O dest aufgefüllt. Diese konzentrierte Lösung ist bei $4^{\circ}C$ längere Zeit haltbar und wurde vor Gebrauch 1:5 mit Aqua dest. verdünnt.

Veronalpuffer mit Gelatine und Ca^{++} , Mg^{++} (GVP $^{++}$)

Isotoner Veronal NaCl-Puffer von pH 7,5 und 15 mS mit 0,1 % Gelatine 0,15 mM Ca^{++} und 1,0 mM Mg^{++} (zugefügt als $CaCl_2$ und $MgCl_2$).

Veronalpuffer mit Gelatine und Dextrose (DGPV $^{++}$)

Mischung aus einem Teil GVP $^{++}$ mit einem Teil 5 % wässriger Glucoselösung mit 0,1 % Gelatine, 0,15 mM Ca^{++} und 1,0 mM Mg^{++} (zugefügt als $CaCl_2$ und $MgCl_2$).

Alsever-Lösung

20,5 g Glucose, 9,7 g Natriumcitrat x 5 H_2O , 4,2 g NaCl und 0,55 g Zitronensäure wurden in H_2O gelöst und ad 1000 ml aufgefüllt.

EDTA-Stammlösung

186,12 g Na_2H -EDTA (Merck Titriplex III 8418) wurden ad 1 l mit Aqua dest aufgefüllt und in 300 ml 1 N NaOH aufgenommen.

Unter Erhitzen auf 70°C im Wasserbad wurde der pH-Wert mit ca. 120 ml einer 2 N NaOH-Lösung auf pH 7,3 - 7,5 eingestellt. Nach Abkühlen der Lösung wurde der pH-Wert nochmals kontrolliert und gegebenenfalls nachgestellt.

2. Testreagentien und Zell-Komplement Intermediärprodukte

a) Testreagentien

C-EDTA Mischung aus 8 ml VPS, 1 ml 0,2 M EDTA-Lösung
pH 7,5

1 ml Meerschweinchenserum (MS)

In diesem Reagenz sind durch Ca^{++} - und Mg^{++} -Entzug (Chelatbildung mit EDTA) C1 und C2 ebenso wie der Faktor B des Pro-perdinsystems funktionell ausgeschaltet.

R3-Reagenz

Zur Herstellung wurden 5 mg Cobratoxin pro 1 ml MS 60 min bei 37°C inkubiert. Dieses Reagenz dient als Quelle von C1, C4 und C2, die durch die Behandlung nicht angegriffen werden. Hingegen werden C3 und C5 aktiviert und verlieren im Anschluß daran ihre biologische Funktion (53).

R4-Reagenz

Es wurden 5 ml 0,16 M Hydrazinlösung mit 20 ml MS gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Mit 0,15 M HCl wurde der pH-Wert auf pH 7,2 gebracht. Durch diese Behandlung wurden C3 und C4 selektiv zerstört (53).

C3

MS-C3 wurde nach der in unserem Labor üblichen Methode gereinigt (63) und in bestimmten Konzentrationen in die Tests eingesetzt.

b) Zellen und Zell-Komplement Intermediärprodukte

Hammelerythrozyten (E)

200-250 ml Hammelblut wurden in 250 ml steriler Alseverlösung aufgenommen. Diese Suspension wurde mindestens 7 Tage bei 4°C gelagert.

30 ml davon wurden mit 150 ml VBS gewaschen und abzentrifugiert (5000 x g, 5 min, 4°C), anschließend mit 150 ml VBS-EDTA resuspendiert. Nach 10 min Inkubation bei 37°C und zweimaligem Waschen in je 150 ml VBS-EDTA Wiederaufnahme des Sediments in 100 ml VBS-EDTA. Die Einstellung der Zellzahl auf eine Konzentration von 1×10^9 E/ml erfolgte durch Hb-Messung eines bestimmten, durch 1:100 Verdünnung mit H₂O lysierten Volumens der E-Suspension anhand einer Eichkurve.

Antikörperbeladene Hammelerythrozyten (EA)

50 ml einer Ambozeptorverdünnung (8 Ambozeptoreinheiten pro 1×10^9 E/ml) wurden mit 50 ml einer E-Suspension (1×10^9 /ml) unter kräftigem Schütteln gemischt.

Nach 20minütiger Inkubation bei 37°C und 2-3maligem Waschen in GVP⁺⁺ wurden die EA in ca. 100 GVP⁺⁺ aufgenommen und auf 5×10^8 EA/ml eingestellt.

EAC 142 Intermediärkomplex

1 Volumen EA-Suspension (5×10^8 EA/ml) wurden mit dem gleichen Volumen einer R3-Verdünnung (1:100 - 150 mit DGVP⁺⁺) gemischt und 10 min bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in DGVP⁺⁺ wurde das Sediment resuspendiert und das Ausgangsvolumen wieder hergestellt (Konzentration von $1,3 \times 10^8$ Zellen/ml) (98).

Die Bildung dieses Intermediärproduktes wurde auf zwei Arten kontrolliert:

- a) Positivkontrolle: 0,4 ml GVP⁺⁺ wurden mit 0,2 ml EAC 142 und 0,2 ml C-EDTA gemischt und bis zur vollständigen Lyse bei 37°C inkubiert. Die Zeit bis zur vollständigen Lyse wurde gemessen.

Zellen, die genügend C42-sites tragen, lysieren unter diesen Bedingungen innerhalb von 2 min zu 100 %.

- b) Negativkontrolle: Wurden jedoch 0,4 ml GVP_p⁺⁺, 0,2 ml R4 (1:80 mit GVP⁺⁺) und 0,2 ml Zellen inkubiert so darf keine Lyse erfolgen, da C3 in diesem System fehlt.

EAC 1423 Intermediärkomplex

Zur Herstellung wurde jeweils ein Teil EAC 142 ($1,3 \times 10^8$ /ml) und ein Teil C3 einer bestimmten Konzentration gemischt und 10 min bei 37°C inkubiert. Dann wurde zweimal gewaschen und das Sediment im Ausgangsvolumen in DGVP⁺⁺ aufgenommen. Die C3-Verdünnung wurde nach Vorversuchen so gewählt, daß maximal 90 % der möglichen Lyse (F-Wert) erreicht wurden.

c) Testsysteme für C3 und C3b INA

C3-Test

Der Test wurde durchgeführt im Mikrolitersystem von Eppendorf.

Ansatz: 0,1 ml EAC 142 ($1,3 \times 10^8$ /ml)
 0,1 ml DGVP⁺⁺
 0,1 ml Probe
 1,0 ml R4-Verdünnung (1:1500 mit DGVP⁺⁺)
 60 min 37°C

Nach Zentrifugation zur Sedimentierung der nicht
lysierten Zellen wurde das Hb im Überstand bei
412 nm im Gilford Spektralphotometer gemessen.

Bei allen Versuchen wurden folgende Kontrollen durchgeführt:

100 % Lyse (F-Wert) 0,1 ml EAC 142
 1,2 ml H₂O

Zellkontrolle (D-Wert) 0,1 ml EAC 142
 1,2 ml DGVP⁺⁺

Systemkontrolle (C-Wert) 0,1 ml EAC 142
 0,2 ml DGVP⁺⁺
 1,0 ml R4

C3b INA-Test

Prinzip: Hemmung der Immunnämolyse.

Die orientierende Testung von Fraktionen während der Säulen-
chromatographie wurde nach folgendem Ansatz durchgeführt:

0,1 ml EAC 142 ($1,3 \times 10^8$ /ml)

0,1 ml C3-Verdünnung

0,1 ml Fraktion

15 min 37°C

1,0 ml R4

60 min 37°C

abzentrifugieren, messen

Erklärung: Bei Anwesenheit von C3b INA können die gebildeten EAC 1423 Zellen infolge der C3b-Zerstörung nicht mehr entwickelt werden.

Für genauere Messungen wurde folgender Ansatz benutzt:

0,1 ml EAC 1423 ($1,3 \times 10^8$ /ml)

0,1 ml DGVP⁺⁺

0,1 ml C3b INA

30 min 37°C

abzentrifugieren, zweimal waschen in DGVP⁺⁺,

resuspendieren in

0,3 ml DGVP⁺⁺

1,0 ml R4

60 min 37°C

Bei der Kontrolle wurde der C3b INA durch Puffer ersetzt.

d) Proteinbestimmung

Der Proteingehalt einer Probe wurde entweder durch Extinktionsmessung bei 280 nm im Gilford Spektralphotometer oder nach der von Lowry angegebenen Methode bestimmt. Eichsubstanz war Rinderserumalbumin (70).

3. Reinigung des C3b INA aus Meerschweinchenserum

a) Erstes Reinigungsverfahren

Euglobulin-Fällung

Ausgangsmaterial für die Isolierung waren 500 - 1000 ml Meerschweinchenserum, die bei 4°C über Nacht gegen 10 Liter eines 0,02 M KPO_4 -Puffers 2,5 mS von pH 7,5 und 0,002 M EDTA dialysiert wurden. Das Präzipitat (Euglobuline) wurde dann 15 min lang bei 15.000 Upm in einer Zeta-Kühlzentrifuge (Christ, Osterode, Harz) abzentrifugiert. Der Überstand (Pseudoglobuline) wurde verworfen und das Präzipitat in ca. 40 ml eines 0,02 M KPO_4 -Puffers pH 8,0 aufgenommen. Diesem Puffer waren 0,002 M EDTA und NaCl zugesetzt, bis eine Leitfähigkeit von 4 mS erreicht worden war.

QAE-Sephadex A 25 Chromatographie

Jeweils 20 ml dieser Euglobulinlösung wurden über eine QAE-Sephadex A 25-Säule mit einer Packung von 2,5 x 40 cm geschickt. Diese Säule war mit dem gleichen Puffer äquilibriert, in dem die Euglobuline aufgenommen worden waren. Zusätzlich enthielt dieser Puffer, ebenso wie die bei den folgenden Chromatographieschritten verwendeten Puffer, 0,01 % NaN_3 , um bakterielles Wachstum zu verhindern.

Der Durchfall wurde verworfen und die Säule solange mit Startpuffer gespült, bis nach der Proteinschreibung (Uvicord II, LKB-Instrument, Bromma, Schweden) kein Protein mehr eluiert wurde.

Die Abtrennung der noch auf der Säule gebundenen Proteine erfolgte durch lineare Salz-Gradienten-Elution von Startpuffer (800 ml) nach 15 mS NaCl in Startpuffer (800 ml). Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug 60 ml/h. Die Fraktionen (180 Tropfen/Röhrchen) wurden durch einen Fraktions-sammler (Ultrorac, LKB-Instrument, Bromma, Schweden) in silikonisierten Glasröhrchen gesammelt. Die aktiven Fraktionen wurden gepoolt und in einer Ultrafiltrationsanlage (Desaga, Heidelberg) auf 20 ml ankonzentriert.

Cellulose CM -Chromatographie

Eine mit CM-Cellulose 2,5 x 30 cm hoch gefüllte Glas-säule wurde mit einem 0,01 M KPO_4 -Puffer pH 6,0, 0,002 M EDTA, 5 mS NaCl, äquilibriert. Nach Dialyse gegen diesen Puffer wurden 20 ml des ankonzentrierten QAE-Sepha-dex A 25-Pools aufgetragen. Die Säule wurde nun mit dem Startpuffer durchgespült. Anschließend wurde mit einem linearen Salz-Gradienten von Startpuffer (300 ml) gegen Startpuffer, der mit NaCl auf 15 mS gebracht worden war (300 ml), eluiert. Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug 30 ml/h. Gesammelt wurden 100 Tropfen/Fraktion. Die aktiven Fraktionen wurden wiederum gepoolt und auf 5 ml ankonzentriert.

Cellulose DEAE Chromatographie

Der ankonzentrierte CM-Pool wurde nach Dialyse gegen einen 0,01 M KPO_4 -Puffer pH 8,0, mit NaCl auf 5 mS gebracht, auf

eine kleine Säule aufgetragen, die mit dem gleichen Puffer äquilibriert war. Die Säule war mit DEAE-Cellulose 1 x 28 cm hoch gefüllt. Nach Spülen mit Startpuffer wurde mit einem Gradienten von Startpuffer (300 ml) gegen mit NaCl auf 15 mS gebrachten Startpuffer (300 ml) eluiert. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 30 ml/h. Es wurden 100 Tropfen/Fraktion gesammelt. Die aktiven Fraktionen wurden wiederum gepoolt und in der Desaga-Ultrafiltrationsanlage auf 1-2 ml ankonzentriert.

Gelfiltration auf Sephadex G 200 superfine

Eine Glassäule wurde 90 cm hoch mit Sephadex G 200 superfine gefüllt (Säulendurchmesser 2,5 cm) und mit einem 0,02 M Tris-HCl-Puffer äquilibriert, der mit NaCl auf 15 mS gebracht worden war und einen pH-Wert von 7,5 besaß. Nach Auftrag des DEAE-Pools wurde mit diesem Puffer eluiert. Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug 2 ml/h. Gesammelt wurden 20 Tropfen/Fraktion.

Affinitäts-Chromatographie mit Sepharose 4B-CN gekoppeltem Anti-Meerschweinchen C3 IgG

Um das in dem C3b INA noch enthaltene C3 zu entfernen, wurde der auf 5 ml ankonzentrierte G 200-Pool über eine kleine Glassäule (Durchmesser 1,5 cm) geschickt, die mit Sepharose 4B-CN gekoppeltem Anti-Meerschweinchen C3 IgG ca. 20 ml hoch gefüllt war. Es wurde mit 100 - 200 ml eines 0,1 M Tris-HCl-Puffers pH 8,0, 0,5 M NaCl gespült und das gesamte Volumen in einer Collodium-Hülse (Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen) auf 1-2 ml ankonzentriert.

Die Kopplung des Anti-Meerschweinchen C3 IgG an die Sepharose 4B-CN Br erfolgte nach der in der Literatur angegebenen Methode (8): 1 g Sepharose 4B-CN Br-Gel wurde in 10^{-3} M HCl gequollen und in einem Glasfilter mit ca. 200 ml dieser Lösung durchgespült (1 g Trockengel ergab 3,5 ml gequollenes Gel). 2 ml einer Anti-Meerschweinchen C3 IgG-Lösung (Proteingehalt 10 mg/ml) wurden mit 3 ml eines 0,1 M NaHCO_3 -Puffers, pH 8,4 und 0,5 M NaCl, vermischt und nochmals mehrere Stunden bei 4°C gegen diesen Puffer dialysiert.

Nach der Dialyse wurden die 5 ml Proteinlösung mit 3,5 ml Sepharose 4B-CN Br-Gel in einem Röhrchen gemischt und 12 h lang bei 4°C vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurde das ungebundene Material mit dem Kopplungspuffer ausgewaschen und die überbleibenden reaktiven Gruppen mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0 für 1-2 h abgesättigt.

Nicht kovalent, sondern nur durch unspezifische Adsorption gebundenes Material wurde durch 3-5maliges alternierendes Spülen mit 0,1 M Acetat-Puffer, 1,0 M NaCl, pH 4 und 0,1 M Borat-Puffer, 1,0 M NaCl, pH 8,0 entfernt. Danach wurde das Gel in eine Glassäule gefüllt und mit einem 0,1 M Tris-HCl-Puffer, 0,5 M NaCl, pH 8,0 äquilibriert.

Durch Spülen mit einem 0,1 M Glycin-HCl-Puffer, pH 2,8, 0,5 M NaCl, konnte das spezifisch gebundene C3 abgespalten werden, und nach Reäquilibrieren mit dem oben beschriebenen Elutionspuffer konnte das so regenerierte Gel wieder benutzt werden.

Die Effizienz der C3-Absorption lag bei 87 % und wurde durch

vergleichende Titration entsprechender Meerschweinchen-serumverdünnungen vor und nach der Affinitäts-Chromatographie bestimmt.

Präparative isoelektrische Fokussierung im granulierten Gel

Als letzter Schritt bei der Reinigung des C3b INA schloß sich eine präparative isoelektrische Fokussierung im granulierten Gel an (93). Das Gel war folgendermaßen zusammengesetzt:

3,1 ml	40 % Ampholyte pH 6-8
97,0 ml	Aqua dest
7,0 g	Sephadex G 75 superfine

150 ml dieser Gelsuspension wurden mit einer Pipette auf einen 20 x 20 x 1 cm Trog (Desaga, Heidelberg) aufgetragen und durch vorsichtiges Bewegen des Trogs auf einer horizontalen Unterlage gleichmäßig verteilt.

Dieses Gel trocknete an der Luft solange, bis sich die Schicht beim Anheben des Trogs um 45° nicht mehr bewegte. Dann wurden mit einem schmalen Spatel an zwei gegenüberliegenden Seiten des Trogs ca. 1 cm breite Gelstreifen ausgehoben. Zusätzlich dazu wurde in der Mitte der Platte ein 0,4 x 7 cm großer Graben ausgehoben, der vom späteren kathodischen Ende der Gelschicht 2-3 cm entfernt war. In diesen Graben wurde der nach der Immunabsorption auf 1 ml ankonzentrierte C3b INA-Pool eingefüllt. Er war zunächst auf einen Restsalzgehalt von 0,001 M dialysiert worden und wurde dann mit ca. 60 mg Sephadex G 75 superfine vermischt. Die Probenlösung enthielt ferner ca. 2 % Trägerampholyte.

Nach Einfüllen der Probe wurden an Anode und Kathode mit Elektrodenlösung getränkte Filterpapierstreifen an das Gel herangeschoben. Die anodische Elektrodenlösung bestand aus einer 1,0 M H_2SO_4 -Lösung, die kathodische aus einer 2,0 M Äthylendiaminlösung.

Der so präparierte Glastrog wurde nun auf den auf 4°C vorgekühlten Kühlblock der Fokussierkammer (DE-Doppelkammer für die Dünnschicht-isoelektrische Fokussierung, Desaga, Heidelberg) gelegt und die Platin-Breitbandelektroden (Desaga, Heidelberg) auf die jeweiligen Filterpapierstreifen gebracht. Dann wurde eine konstante Spannung von 200 V angelegt ($\approx 10 \text{ V/cm}$). Die Ausgangsstromstärke betrug ca. 35 mA. Nach Abfall der Stromstärke auf 20-25 % des Ausgangswertes wurde die Spannung auf 600 V erhöht und bei dieser konstanten Spannung 12-16 h weiterfokussiert. Nach dem Lauf wurde die Gelschicht mit einer Klinge in 0,4 cm breite Querstreifen unterteilt. Jeweils ein Streifen, der in der Breite und Position dem Auftragsgraben entsprach, wurde mit dem Spatel ausgehoben und mit ca. 1 ml eines physiologischen Puffers eluiert. Die verbleibenden Randstreifen wurden mit 1 ml CO_2 freiem Wasser eluiert und zur pH-Messung (bei 20°C mit Phillips pH-Meter) herangezogen.

b) Zweites Reinigungsverfahren

In der letzten Zeit wurde der C3b INA im Rahmen der besseren Ausnutzung des recht teuren Ausgangsmaterials - Meerschweinchen Serum zusammen mit den Faktoren C3, C5 und B - gereinigt. Diese Präparation unterschied sich in den Anfangs-

schritten etwas von der vorher beschriebenen Methode (63,110):

Zu 300 ml MS wurden 6 ml einer 0,5 M EDTA-Lösung pH 7,5 hinzugemischt, so daß das Gemisch eine Endkonzentration von 0,01 M EDTA enthielt. Dieses Gemisch wurde anschließend mit Aqua dest 1:10 verdünnt und mit 0,5 M HCl auf pH 6,0 gebracht. Danach wurde bei 4°C für 30-60 min vorsichtig gerührt. Die Euglobuline wurden dann in einer Zeta-Kühlzentrifuge bei 8000 Upm und 4°C 15 min lang abzentrifugiert und das Präzipitat in 0,01 M KPO_4 pH 6,0, 0,06 M NaCl gelöst.

Dieses Material wurde auf eine mit demselben Puffer äquilibrierte Glassäule vom Durchmesser 5,5 cm aufgetragen, die mit CaOH-Apatit 15 cm hoch gefüllt war. Nach gründlichem Durchspülen der Säule mit Startpuffer wurde mit einem Gradienten von 1000 ml Startpuffer gegen 1000 ml Startpuffer mit 25 mM Phosphat eluiert. 270 Tropfen wurden pro Röhrchen gesammelt. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 150 ml/h.

Die C3b INA-Aktivität enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt und in einem zweiten Schritt auf eine DEAE Cellulose-Säule (5,5 x 20 cm) aufgetragen, die mit einem 0,01 M KPO_4 -Puffer pH 8,0, 0,04 M NaCl äquilibriert war. Die Auftrennung erfolgte auch hier durch Gradientenelution von 1000 ml Startpuffer gegen 1000 ml Startpuffer mit 0,25 M NaCl. Durchflußrate 150 ml/h bei 270 Tropfen pro Röhrchen.

Die aktiven Fraktionen wurden gesammelt und auf einer weiteren CaOH-Apatit-Säule rechromatographiert unter den gleichen Bedingungen wie bei der ersten Säule.

Als letzter Chromatographieschritt folgte eine CM Cellulose-Säule (5,5 x 20 cm), die mit einem 0,01 M KPO_4 -Puffer pH 6,0, 0,04 mS NaCl äquilibriert war. Der Auftrag war vorher mit 0,1 N HCl auf pH 6,0 eingestellt worden. Eluiert wurde mit einem Gradienten von 1000 ml Startpuffer gegen 1000 ml Startpuffer mit 0,35 M NaCl. Die Durchflußrate betrug 150 ml/h, gesammelt wurden wiederum 270 Tropfen pro Fraktion.

Die weitere Präparation erfolgte wie im ersten Reinigungsverfahren beschrieben.

4. Gewinnung des Antiserums

a) Immunisierung

Zur Immunisierung wurde 1 ml eines gereinigten C3b INA-Pools (1,5 mg/ml) mit dem gleichen Volumen von komplettem Freund-Adjuvans zu einer homogenen Masse gemischt. Mit diesem Gemisch wurden zwei Kaninchen immunisiert. Jedem Tier wurde 1 ml verteilt auf Nacken und beide Flanken sc. injiziert. Nach zwei Wochen erfolgte die erste Boosterung auf die gleiche Weise. Die zweite Boosterung erfolgte eine weitere Woche später. Fünf Tage nach der letzten Injektion wurde den Tieren über Punktion der Ohrrendvene Blut entnommen.

b) Herstellung eines Anti-C3b INA - IgG-Präparates

Eine reine IgG-Präparation konnte durch folgendes Vorgehen erhalten werden (51):

Ammoniumpersulfatfällung bei 30 % und 45 % Sättigung

Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose

Gelfiltration über Sephadex G 200

Zunächst wurde ein Volumen Serum mit einem Volumen einer 60 % gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung gemischt und bei Raumtemperatur 4-6 h vorsichtig gerührt. Dann wurde das Präzipitat scharf abzentrifugiert (15 min bei 15.000 Upm), der Überstand verworfen, das Sediment mit Aqua dest. auf das Ausgangsvolumen gebracht. Dieses Volumen wurde mit der gleichen Menge einer 90 % gesättigten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung gemischt und das Präzipitat sofort scharf abzentrifugiert. Das Sediment wurde in Aqua dest. aufgenommen und mindestens 36 h bei mehrfachem Pufferwechsel im Kühlraum gegen einen 0,015 M KPO_4 -Puffer pH 7,5 dialysiert. Nach der Dialyse wurde die Proteinlösung nochmals zentrifugiert, das Präzipitat entfernt und der Überstand auf eine mit DEAE-Cellulose 20 x 3 cm hoch gefüllte Säule aufgetragen, die mit dem Dialysepuffer äquilibriert war. Nach dem Auftrag wurde die Säule mit diesem Puffer durchgespült, der Durchfall gesammelt und auf 5 ml ankonzentriert. Das Konzentrat wurde auf einer 100 x 5 cm Sephadex G 200 Säule gelfiltriert, die mit einem 0,015 M KPO_4 -Puffer pH 7,5, der mit NaCl auf 15 mS gebracht war, äquilibriert worden war. Mit diesem Puffer wurde eluiert, der 7 S-Peak gesammelt und ankonzentriert.

c) Kopplung des Anti-C3b INA - IgG an Sepharose 4B-CN Br

Die Kopplung des Anti-C3b INA - IgG erfolgte nach der oben für Anti-C3 IgG beschriebenen Methode (8). Die zur Kopplung benutzte Anti-C3b INA - IgG-Lösung besaß einen Proteingehalt von 15 mg/ml. Das fertige Gel wurde in eine als Säule benutzte 5 ml Plastikspritze gefüllt und mit einem 0,1 M Tris-HCl-Puffer, 0,5 M NaCl, pH 8,0 äquilibriert.

5. Reinheitsnachweis

a) Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese wurde nach der von Scheidegger beschriebenen Methode durchgeführt (107). Ein sechs Objektträger aufnehmender Plastikträger wurde mit 20 ml einer 1,0 % Agaroselösung beschichtet.

Die Lösung setzte sich folgendermaßen zusammen:

10 g Agarose

10 ml 0,5 M EDTA-Lösung pH 7,5

1 ml 10 % NaN_3 -Lösung

500 ml Elektrophoresepuffer pH 8,6 (Merck, Darmstadt)

489 ml Aqua dest.

Nach Erstarren der Lösung wurden mit einer Stanze (LKB-Instrument, Bromma, Schweden) Rillen und Löcher ausgestanzt. In die Löcher wurden jeweils 10 μl des zu testenden Materials eingefüllt. Der so präparierte Träger wurde dann in die Elektrophoresekammer (Gelman Instrument Company) eingelegt und seine Enden über Celluloseacetatfolien mit der Pufferlösung der Elektrodenkammern verbunden. Die Elektrophorese wurde in

der Kälte (4°C) bei 8 V/cm für 150 min durchgeführt.

Nach dem Lauf wurden jeweils 100 μl eines Anti-Meerschwein-
chenserums (Behringwerke, Marburg/Lahn) oder eines anderen
Antiserums in die Rillen eingefüllt. Die Entwicklung von
Präzipitatlinien erfolgte nach ca. 24 h. Anschließend wurde
das nicht präzipitierte Protein durch mindestens 48 h Spülen
in 1 % NaCl-Lösung entfernt. Die Präparate wurden nach 2 h
Wässern an der Luft getrocknet.

Die Färbung erfolgte für 15 min in einer Coomasie-Brillant-
Blau-Lösung folgender Zusammensetzung:

5 g Coomasie Brilliant Blau R 250 (Serva, Heidelberg)
450 ml Äthanol 96 % (Merck, Darmstadt)
100 ml Eisessig (Merck, Darmstadt)
450 ml Aqua dest.

Nach der Färbung wurden die Präparate in einem Gemisch aus
Methanol-Eisessig- H_2O (45:10:45) bis zur vollständigen Ent-
fernung der Hintergrundfärbung entfärbt.

b) Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony

Auch die Doppelimmundiffusion wurde in 1 % Agarose durchge-
führt. Die Rosetten wurden mit einer entsprechenden Stanze
ausgestanzt. Die Löcher faßten jeweils ein Volumen von 10 μl .
Nach 12 - 24 h bildeten sich Präzipitationslinien aus. Die
Weiterverarbeitung erfolgte dann wie unter a) angegeben (89).

c) Analytische Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAA)

Die Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde mit der Disk-

Elektrophoreseeinrichtung der Firma Shandon (Shandon Labortechnik, Frankfurt) durchgeführt. Benutzt wurden Glasröhrchen (Desaga, Heidelberg) von 10 cm Länge und einem inneren Durchmesser von 0,6 cm. Gelsysteme und Puffer wurden wie von Maurer angegeben verwandt (71). Abweichend von dieser Vorschrift wurde Natriumpersulfat anstelle von Ammoniumpersulfat zur Polymerisation verwendet, da bei Benutzung von Ammoniumpersulfat NH_4^+ -Ionen entstehen, die Komplementfaktoren und andere Serumproteine inaktivieren (10).

Vor dem Auftrag wurde die Probe mit dem gleichen Volumen einer 20 % Saccharoselösung und 5 μl einer 0,001 % Bromphenolblaulösung versetzt. Maximal 100 μl wurden pro Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 5 mA/Gel in dem Kühlraum (4°C) solange, bis die Bromphenolblaubande das untere Gelende (Anode) erreichte.

Nach dem Lauf wurde das Gel vorsichtig aus dem Glasröhrchen entfernt, die Farbstoffbande durch Einstich mit einer Kanüle markiert und das Gel 12 h lang in einem Gemisch aus Methanol:Eisessig:Aqua dest (500:50:450) fixiert. Die anschließende Färbung erfolgte 1 h lang in der unter a) beschriebenen Färbelösung. Zur Entfärbung kamen die Gele in einen Diffusionsentfärbeapparat, der den unter a) beschriebenen Entfärber enthielt. Die entfärbten Gele wurden in 7,5 % Essigsäure aufbewahrt. Gelegentlich wurden Gele nach dem Lauf ohne Fixierung und Färbung in einem Gelfraktionator (Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich) in 1-2 mm lange Fraktionen geschnitten. Beim Schneiden wurden die Gelscheiben

automatisch zerkleinert und mit einem physiologischen Puffer gemischt, in den die Proteine diffundieren konnten. Die so gewonnenen Überstände der einzelnen Fraktionen wurden getestet. Zum Positionsvergleich wurde ein Gel aus demselben Lauf nach der oben beschriebenen Methode gefärbt.

d) SDS-Gelelektrophorese

Der derzeit feinste Reinheitsnachweis besteht in der Elektrophorese in Anwesenheit von SDS. Eine genaue Beschreibung folgt unter 6 a). Aufgetragen wurden zwischen 3 und 10 µg Protein/Gel.

6. Physikochemische Untersuchungen

a) Bestimmung des Molekulargewichts

Gelfiltration

Gemäß der von Andrews (7) angegebenen Methode wurde eine Molekulargewichtsbestimmung auf Biogel P-300 Säulen (1,5 x 95 cm bzw. 1 x 50 cm) durchgeführt.

Die Säulen wurden mit einem 0,01 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 äquilibriert, der mit NaCl auf 15 mS gebracht worden war. Mit diesem Puffer wurde auch eluiert. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 6 ml/h; gesammelt wurden 25 Tropfen pro Fraktion. Das Ausschlußvolumen wurde durch Dextranblau 2000 ($\text{MG } 2 \times 10^6$) bestimmt. Als Referenzsubstanzen dienten Katalase ($\text{MG } 230.000$), IgG-7S ($\text{MG } 150.000$) und Hb ($\text{MG } 65.000$).

SDS-Gelelektrophorese

Eine recht genaue Methode zur Bestimmung des Molekulargewichts stellt die Elektrophorese in Anwesenheit des Detergens Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) dar. Es wurde in etwas modifizierter Form die von Weber und Osborne beschriebene Methode angewandt (120). Zur Elektrophorese wurden die Shandon-Disk-Elektrophoreseeinrichtung und 0,6 x 10 cm Glasröhrchen benutzt.

Die Gele und Puffer setzten sich folgendermaßen zusammen:

Acrylamidlösung für 5 % Gele: 11,1 g Acrylamid
0,44 g Bisacrylamid
ad 100 ml Aqua dest

Gelpuffer: 7,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
27,05 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
2,0 g SDS
ad 1000 ml Aqua dest

Zur Gelbereitung wurden folgende Lösungen gemischt:

15,00 ml Gelpuffer
13,50 ml Acrylamidlösung
1,50 ml Ammoniumpersulfat (30 mg/2 ml Aqua dest)
0,05 ml TEMED

Zur Herstellung des Elektrophoresepuffers wurden Aqua dest. und Gelpuffer zu gleichen Teilen gemischt.

Zum Aufschluß des Proteins wurden die Proben zu gleichen Teilen mit Probenpuffer folgender Zusammensetzung gemischt und 3 min bei 100°C gekocht:

Probenpuffer: 2 g SDS

10 ml Glycerin 87 %

ad 100 ml 1 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0

Sollten die zu untersuchenden Proben reduziert werden, wurden diesem Probenpuffer zusätzlich vor Gebrauch 3 % (V/V) Mercapto-
äthanol oder 3 % (g/V) Dithiothreitol zugegeben. Vor dem Lauf
wurde das Probenpuffergemisch jeweils mit 5 µl einer 0,001 %
Bromphenolblau-Lösung versetzt.

Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 8 mA/Gel für etwa
4 - 5 h und wurde abgebrochen, sobald die Farbstoffbande das
untere (anodische) Gelende erreicht hatte. Die Weiterverar-
beitung der Gele erfolgte wie bei der PAA beschrieben.

Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte durch Vergleich
des Rf-Wertes (Wanderungsstrecke/Gellänge) der zu untersuchen-
den Substanz mit den Rf-Werten von Referenzsubstanzen. Als Re-
ferenzsubstanzen wurden benutzt: RNA-Polymerase aus E.coli
(MG der bei Reduktion entstehenden Untereinheiten: 39.000,
155.000, 165.000); Rinderserumalbumin (MG 68.000); Chymo-
trypsinogen (MG 25.000) und Trypsininhibitor aus Sojabohnen
(MG 21.500). Aufgetragen wurden jeweils 5 - 10 µg Marker bzw.
Probe.

b) Sedimentationskonstante

Die Bestimmung der Sedimentationskonstanten erfolgte mit
Hilfe eines linearen Saccharosegradienten in einer Beckman
L 2/65 B Ultrazentrifuge, Schwingbecher-Rotor Beckman SW 40
und Beckman Polyallomer-Tubes Nr. 33 1374. Der lineare Gra-

dient von 5 - 30 % Saccharose in einem physiologischen Puffer wurde mit einem Gradientenmixer der Buchler Corporation hergestellt. Der Lauf ging über 18 h bei 4°C und 40.000 Upm. Referenzsubstanzen waren: Katalase (11,2 S), IgG (7 S) und Hb (4,3 S) (54). Nach dem Lauf wurden die Tubes über einen Isco 640 Dichtegradientenfractionator entleert, der an einen UV-Analysator mit Schreiber angeschlossen war. Gesammelt wurden 6 Tropfen pro Fraktion.

Die Referenzsubstanzen wurden folgendermaßen bestimmt:

Katalase (MG 230.000; 11,2 S)

Die Katalaseaktivität wurde im Sprudeltest bestimmt. Es wurde eine Verdünnungsreihe der Probe hergestellt und jeweils 50 µl einer Verdünnung mit der gleichen Menge einer 1:10 verdünnten Perhydraulösung vermischt. Das bei der enzymatischen Reaktion entstehende Sauerstoffgas war als Auftreten von Bläschen gut auszumachen. "

IgG (MG 150.000; 7,0 S)

Als IgG wurde ein gegen Hammelerythrozyten gerichtetes IgG benutzt. Durch Inkubation mit Hammelerythrozyten entstanden EA, die im hämolytischen Test mit 1:1000 verdünntem Meerschweinchenserum als Komplementquelle lysiert werden konnten.

Hb (MG 65.000; 4,3 S)

Der Hämoglobulingehalt der Probe wurde bei 412 nm photometrisch bestimmt.

c) Isoelektrischer Punkt

Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes wurden zwei Verfahren angewandt, denen jedoch dasselbe Prinzip zugrunde liegt.

Analytische isoelektrische Fokussierung im granulierten Gel

Eine ausführliche Beschreibung dieses Verfahrens wurde bei der präparativen isoelektrischen Fokussierung gegeben. Für die analytischen Läufe wurden lediglich 20 x 10 cm Glasplatten benutzt und entsprechend weniger Gel aufgetragen (30 ml). Die Probe (50 µl) wurde mit Hilfe eines großen Deckgläschens in der Mitte der Platte, ca. 2 cm vom späteren kathodischen Ende entfernt, aufgetragen. Fokussiert wurde im Bereich pH 3,5 - 10, 5 - 7 und 6 - 8. Laufbedingungen wie bei der präparativen isoelektrischen Fokussierung.

Isoelektrische Fokussierung im Dichtegradienten

Bei diesem Verfahren wird der Ampholytgradient durch einen Saccharosegradienten stabilisiert.

Benutzt wurde die LKB 8100 Ampholine Fokussierungssäule.

Fokussiert wurde auch hier im pH-Bereich von pH 3 - 10, 5 - 7 und 6 - 8. Diese Läufe wurden nach der Bedienungsanleitung dieses Gerätes durchgeführt. Die pH-Messung nach dem Lauf erfolgte bei 0°C.

D) ERGEBNISSE

1. Reinigung des C3b INA aus Meerschweinchenserum

Es wurde ein Reinigungsschema entwickelt, nach dessen Anwendung ein für Meerschweinchen bisher noch nicht beschriebenes reines Enzympräparat vorliegt. Im folgenden werden die Präparationsschritte dargestellt (siehe Tabelle 2 und 3), wobei die technischen Einzelheiten im Material- und Methodenteil beschrieben wurden.

Die Reinigung begann mit einer Euglobulin-Fällung bei pH 7,5 ausgehend von 500-1000 ml Meerschweinchenserum. C3b INA-Aktivität fand sich sowohl im Überstand als auch im Präzipitat. Die Euglobuline (Präzipitat) wurden gelöst, auf eine QAE-Sephadex A 25-Säule aufgetragen und mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert. C3b INA-Aktivität wurde im Bereich von 5-6 mS gefunden.

Nach Ankonzentration und Dialyse wurde der Pool auf eine CM-Cellulose-Säule aufgetragen. Bei Elution mit einem linearen NaCl-Gradienten löste sich hier die Aktivität im Bereich von 5-10 mS.

Als nächster Reinigungsschritt folgte eine Chromatographie auf DE-Cellulose. Die Aktivität fand sich nach Elution mit einem linearen NaCl-Gradienten im Bereich von 7-10 mS.

Durch anschließende Gelfiltration auf Sephadex G 200 sollten als Kontaminanten noch verbliebene Proteine abgetrennt werden. Durch diesen Schritt konnte C3 fast vollständig vom C3b INA abgetrennt werden: Der C3b INA wurde im 19 S-Peak vor C3

Tabelle 2

Reinigung des C3b INA aus Meerschweinenserum I

Trennverfahren	Trennbedingungen		Elutionsbedingungen
	Startpuffer	Gradient	
<u>Euglobulin-Fällung</u>	0,02 M KP0_4 pH 7,5 0,002 M EDTA	2,5 mS	
<u>Säulenchromatographie</u> QAE Seph. A 25	0,02 M KP0_4 pH 8 0,04 M NaCl 0,002 M EDTA	bis 0,15 M NaCl	5 - 6 mS NaCl
<u>CM-Cellulose</u>	0,01 M KP0_4 pH 6 0,002 M EDTA 0,05 M NaCl	bis 0,15 M NaCl	5 - 10 mS NaCl
<u>DEAE-Cellulose</u>	0,01 M KP0_4 pH 8 0,05 M NaCl	bis 0,15 M NaCl	7 - 10 mS
<u>Gelfiltration</u> Seph. G 200 superfine	0,02 M Tris-HCl pH 7,5 0,15 M NaCl		kurz hinter Dextran-blau im 19 S Peak
<u>Affinitätschromatographie</u> Sepharose 4B-CN gekoppeltes Anti-Meerschweinchen C3 IgG	0,1 M Tris-HCl pH 8 0,5 M NaCl		Durchfall
<u>Präp. isoelektrofokuss.</u> Seph. G 75 superfine in 1,15 % Ampholyten pH 6-8	10 V/cm		pH 6,3

Tabelle 3

Reinigung des C3b INA aus Meerschweinenserum II

Trennverfahren	Trennbedingungen		Elutionsbedingungen
	Startpuffer	Gradient	
<u>Euglobulin-Fällung</u>	-	-	-
<u>Säulenchromatographie</u> CaOH-Apatit	0,01 M KPO_4 pH 8 0,06 M NaCl	bis 25 mS KPO_4	10 - 14 mS
DEAE-Cellulose	0,01 M KPO_4 pH 8 0,04 M NaCl	bis 0,25 M NaCl	6 - 9 mS
CaOH-Apatit (Rechromatographie)	s.o.	s.o.	s.o.
CM-Cellulose	0,01 M KPO_4 pH 6 0,04 M NaCl	bis 0,35 M NaCl	6 - 10 mS

Die restlichen Schritte wie bei I (Tab.2 Gelfiltration ff.).

eluiert. Durch die anschließende Immunabsorption mit an Sepharose-4B gekoppeltem Anti-C3 IgG sollten letzte, hämolytisch nicht mehr nachweisbare Spuren von C3 aus dem Präparat entfernt werden. Nach diesem Schritt war auch antigenetisch kein C3 mehr nachzuweisen.

Auch bei dem zweiten Reinigungsschema wurde mit einer Euglobulin-Fällung begonnen, die diesmal aber bei pH 6 durchgeführt wurde. Ausgangsmaterial waren auch hier ca. 500 ml MS. Die Euglobuline (Präzipitat) wurden gelöst und auf eine CaOH-Apatit-Säule aufgetragen. Die Elution des C3b INA erfolgte mit einem linearen KPO_4 -Gradienten zwischen 10-14 mS.

Als zweiter Schritt folgte eine Chromatographie auf DEAE-Cellulose, wo sich bei Elution mit einem linearen NaCl-Gradienten die Aktivität im Bereich von 6-9 mS fand. Anschließend wurde auf einer CaOH-Apatit-Säule unter den gleichen Bedingungen wie bei der ersten Säule rechromatographiert.

Als letzter Chromatographieschritt folgte eine Chromatographie auf einer CM-Cellulose-Säule. Der C3b INA wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten bis 35 mS NaCl im Bereich von 6-10 mS eluiert.

Die dann folgenden Reinigungsschritte sind oben (Tab.2) beschrieben (Gelfiltration ff.).

Als letzter Schritt folgte bei beiden Reinigungsmethoden eine präparative isoelektrische Fokussierung im Bereich von pH 6-8. Die C3b INA-Aktivität fand sich stets im Bereich von pI 6,2-6,5 (gemessen bei 20°C). Das Reinigungsschema ist in der Tabelle

2 und 3 zusammengefaßt. Die Abbildungen 3 - 7 zeigen die typischen Elutionsbilder.

Das Endpräparat enthielt zwischen 0,5 und 1,5 mg Protein/ml. Eine Angabe der Ausbeute kann nur grob auf der C3b INA-Proteinbasis, nicht auf der Aktivitätsbasis gegeben werden, da aus dem Vollserum heraus die C3b INA-Aktivität mit dem benutzten Testsystem nicht getestet werden konnte. Mit Hilfe der radialen Immundiffusion nach Mancini wurde eine C3b INA Serumkonzentration von 540 µg/ml Meerschweinchenserum gefunden (Abb.8)

2. Gewinnung eines monospezifischen Antiserums gegen C3b INA

Das durch Immunisierung mit dem reinen C3b INA-Präparat gewonnene Antiserum zeigte in der Immunelektrophorese gegen Meerschweinchenserum nur eine Bande (Abb.9).

3. Reinheitsnachweis

Die Reinheit des C3b INA-Präparates wurde durch Immunelektrophorese, analytische PAA und SDS-Gelelektrophorese geprüft (Abb.9).

- a) In der Immunelektrophorese zeigte sich gegen Anti-Meerschweinchenserum nur eine Bande im β -Bereich.
- b) Bei der Analyse desselben Präparates auf einem analytischen PAA-Gel zeigte sich ebenfalls nur eine Bande, der im Test C3b INA-Aktivität zugeordnet werden konnte.
- c) Auch in der SDS-Gelelektrophorese ergab dieses Material eine Bande.

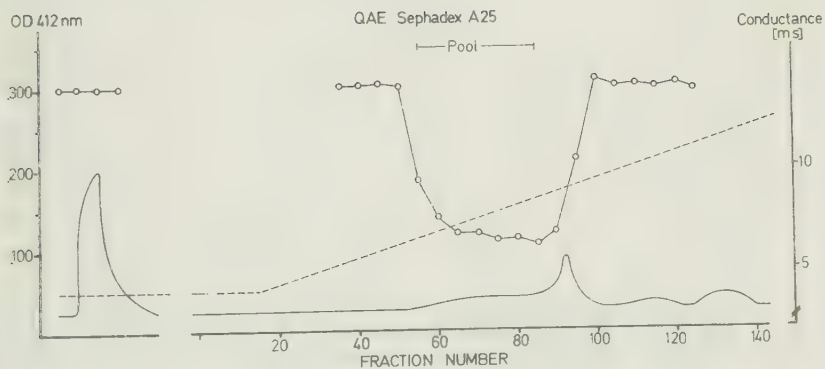


Abb. 3: Chromatographie an QAE Sephadex A 25 (I)

— Proteinschreibung (256 nm)
 ---- Leitfähigkeit (mS)
 o-o-o C3b INA-Aktivität (OD 412 nm)

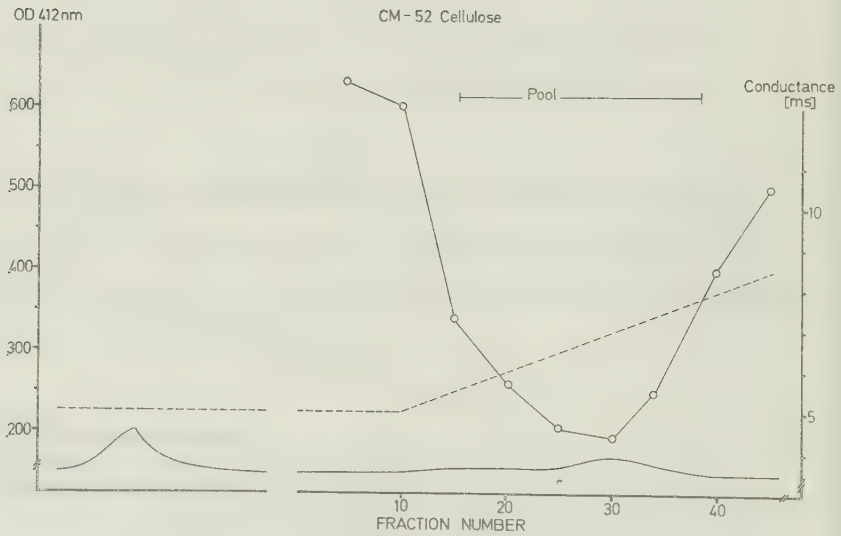


Abb. 4: Chromatographie an CM-Cellulose (I)

— Proteinschreibung (256 nm)
 ---- Leitfähigkeit (mS)
 o-o-o C3b INA-Aktivität (OD 412 nm)

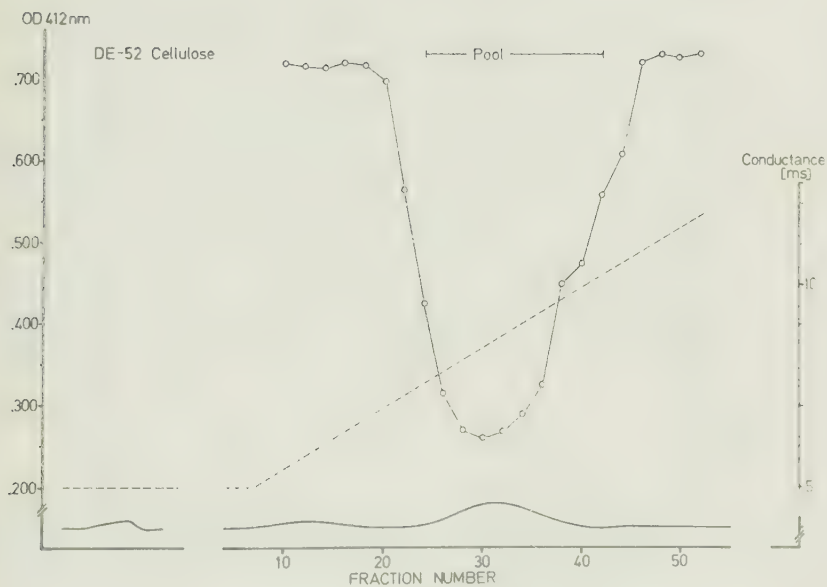


Abb. 5: Chromatographie an DE-Cellulose (I)

- Proteinschreibung (256 nm)
- Leitfähigkeit (mS)
- o-o-o C3b INA-Aktivität (OD 412 nm)

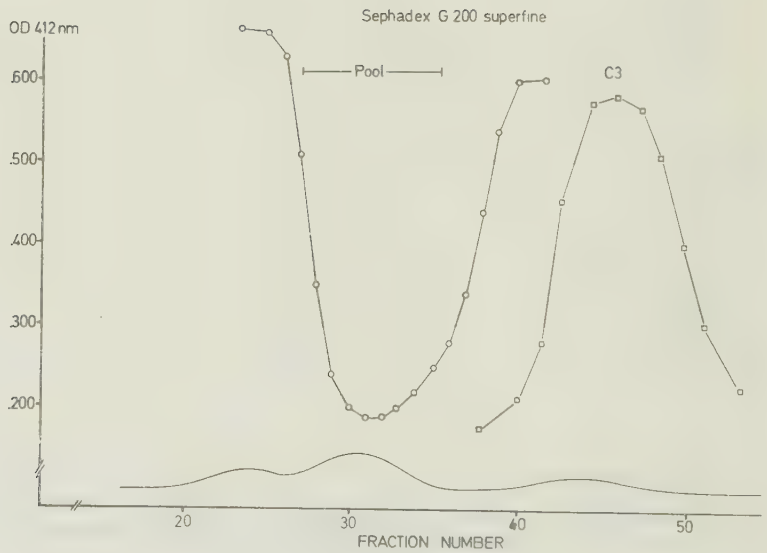


Abb. 6: Gelfiltration auf Sephadex G 200 superfine (I u. II)

o-o-o C3b INA (OD 412 nm)

□-□-□ C3 (OD 412 nm)

— Proteinschreibung (256 nm)

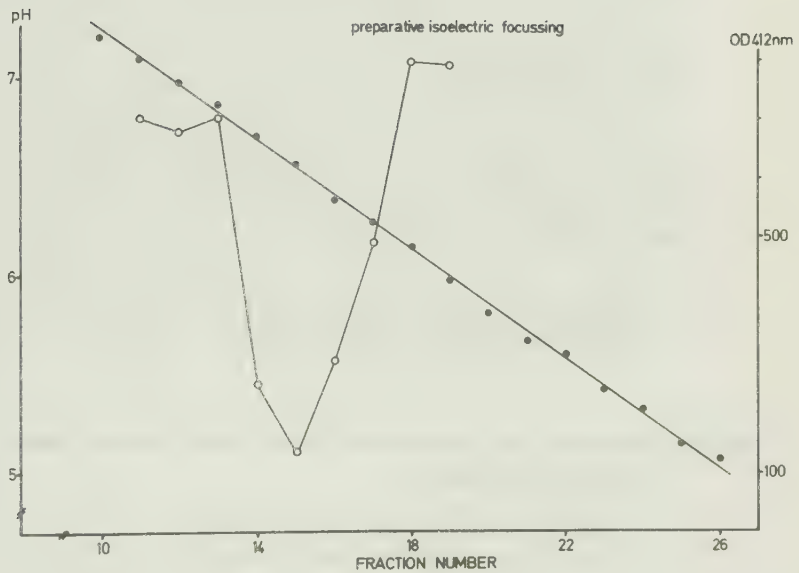


Abb. 7: Präparative isoelektrische Fokussierung (I u. II)

--- pH Gradient (gemessen bei 20°C)

o-o-o C3b INA (OD 412 nm)

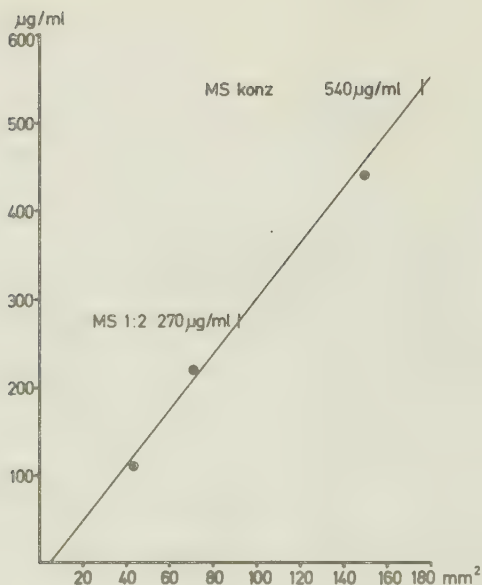


Abb.8: Bestimmung der Serumkonzentration durch radiale Immundiffusion nach Mancini.

1 % Agarose mit 2 % Anti-C3b INA Serum.

Referenzprotein: C3b INA (nach Immunabsorption)

a) 440 µg/ml

b) 220 µg/ml

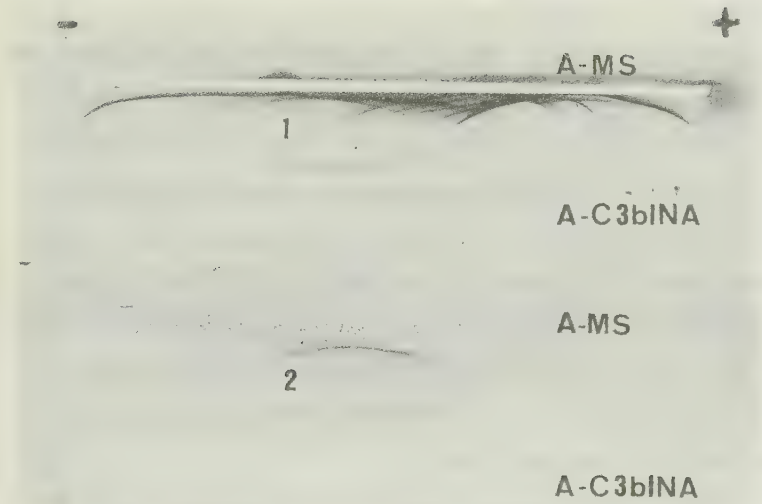
c) 110 µg/ml

Der Serumgehalt des C3b INA in MS wurde bestimmt durch Vergleich des Quadrats der Diffusionsringe von jeweils 10 µl MS konz. und 1:2 verdünnt mit den entsprechenden Werten der verschiedenen Konzentrationen des Referenzproteins.

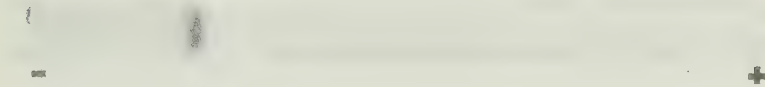
(Mancini, G., Carbonara, A.O., Heremans, F.J.

Immunochemical quantitation of antigens by single radial immundiffusion.

Immunochemistry 2, 235 (1967))



a)



b)

Abb. 9: Reinheitsnachweis

a) Immunelektrophorese: 1 = MS

2 = C3b INA

b) SDS-Gelelektrophorese: 5 % Acrylamid

Der Aktivitätsnachweis zu dieser SDS Bande wurde folgendermaßen geführt:

Ein Teil eines reinen, aktiven C3b INA-Pools wurde in einer SDS-Gelelektrophorese getestet. Es zeigte sich eine Bande (s.o.). Ein anderer Teil desselben Pools wurde über eine Sepharose-4B Anti-C3b INA - IgG-Säule geschickt. Das Eluat enthielt keine C3b INA-Aktivität mehr und ergab auch keine Proteinbande. Nach gründlichem Spülen wurde der C3b INA mit 2 M NaSCN in 0,1 n Tris-Puffer pH 7 abgesprengt. Das abgesprengte Material zeigte im Test wieder volle Aktivität. In der SDS-Gelelektrophorese bot dieses Material wieder eine Bande in derselben Position wie die des Ausgangsmaterials.

4. Physikochemische Charakterisierung des C3b INA

Die nächste Aufgabe bestand darin, die physikochemischen Daten des gereinigten C3b INA zu bestimmen.

Die nach der von Andrews angegebenen Methode durchgeführte Molekulargewichtsbestimmung auf Sephadex G 200 sf und Biogel P 300-Säulen ergab ein Molekulargewicht von approx. 260.000 D (Abb.10). Eine zusätzliche Bestimmung erfolgte nach der von Weber und Osborne angegebenen Methode im 5 % Acrylamidgel unter Gegenwart von 1 % SDS.

Die Molekulargewichtsbestimmung durch SDS-Gelelektrophorese wurde unter nichtreduzierenden wie auch reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Die Läufe unter nichtreduzierenden Bedingungen ergaben immer eine Bande, die nach Vergleich mit der Lage der Marker einem Molekulargewicht von 140.000 entsprach (Abb.11). Unter re-

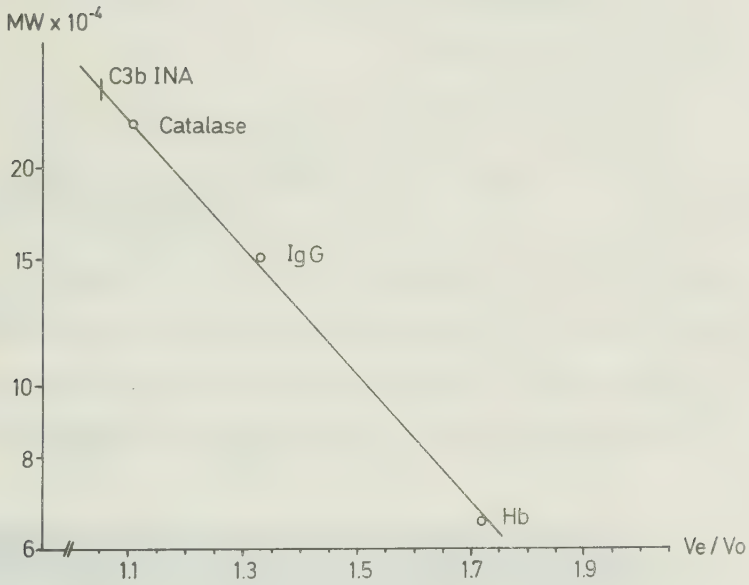


Abb. 10: Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration auf Biogel P 300.

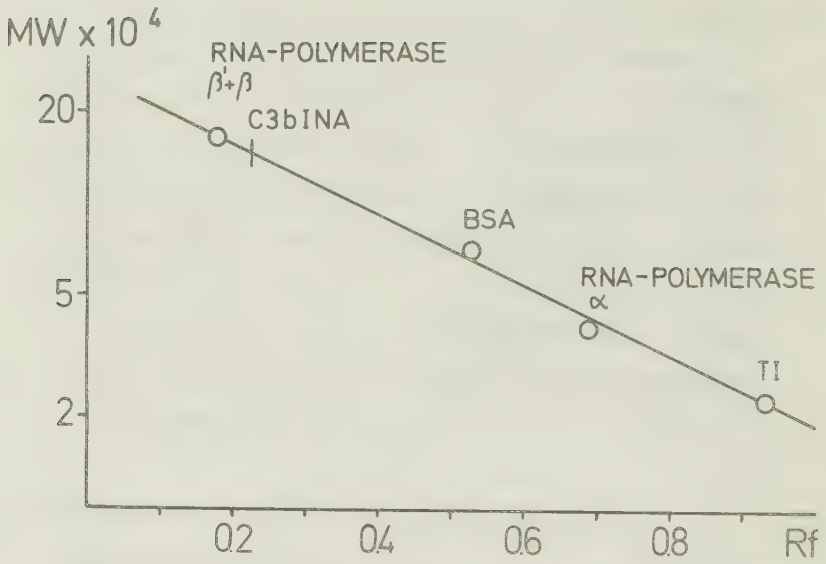


Abb. 11: Molekulargewichtsbestimmung durch SDS Gelelektrophorese ohne Reduktion.

duzierenden Bedingungen, in Anwesenheit von 3 % Dithiothreitol oder Mercaptoäthanol, erschien eine Bande, die deutlich anodischer wanderte. Ihre Position entsprach einem Molekulargewicht von 105.000 . Weitere Banden konnten auch bei Elektrophorese mit 10 % Acrylamidgel nicht nachgewiesen werden (Abb.12).

Die Sedimentationskonstante wurde durch Ultrazentrifugation in einem linearen Dichtegradienten von 5 - 30 % Saccharose bestimmt. Es wurde ein Wert von 5,5 S ermittelt (Abb.13).

Durch analytische isoelektrische Fokussierung in den pH-Bereichen pH 3-10, pH 5-7 und pH 6-8 wurde der isoelektrische Punkt (IP) des C3b INA bestimmt. Der IP lag bei pH 6,3 (Abb.14).

Die physikochemischen Daten sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt (Tab.4).

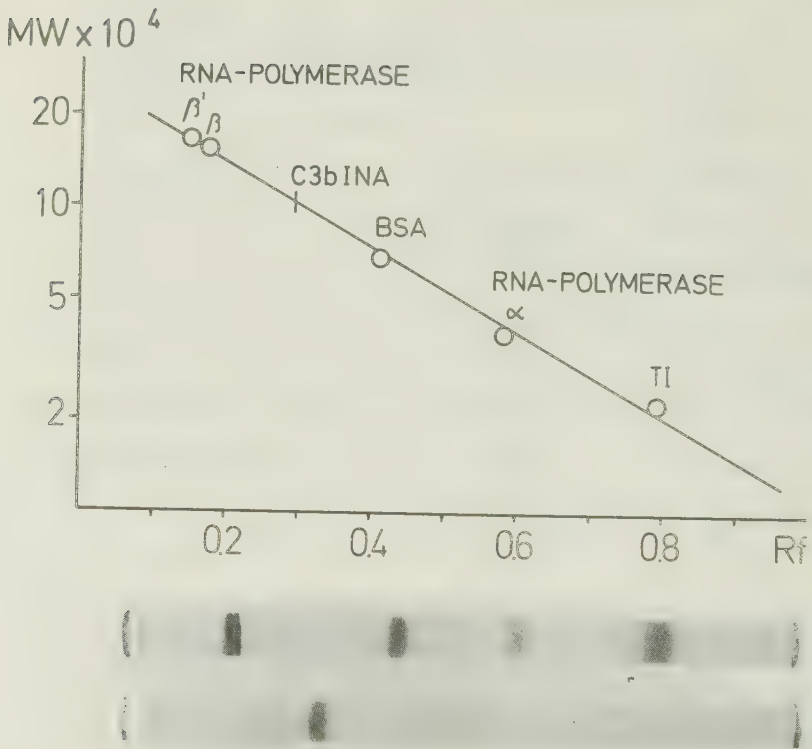


Abb. 12: Molekulargewichtsbestimmung durch SDS Gelelektrophorese nach Reduktion mit 3 % Mercaptoäthanol.

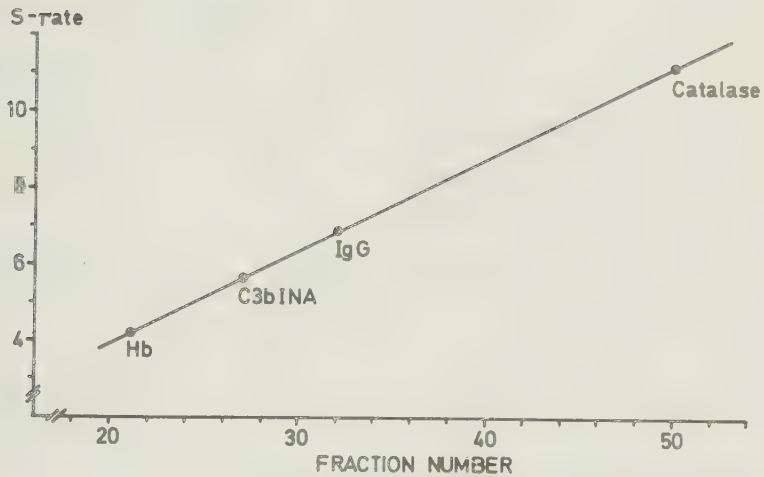


Abb. 13: Bestimmung der Sedimentationskonstante durch Ultrazentrifugation im linearen Dichtegradienten von 5-30 % Saccharose.

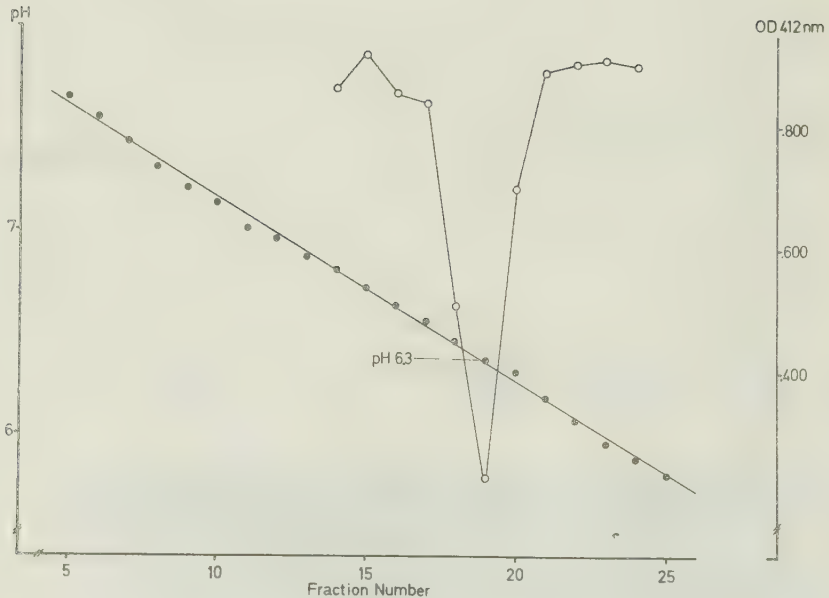


Abb. 14: Analytische isoelektrische Fokussierung im granulierten Gel.

Tabelle 4

Eigenschaften des Meerschweinchen C3b INA

Molekulargewicht	140.000 SDS (nicht red.) 260.000 Biogel P 300
Sedimentationskonstante	5,5 S
Isoelektrischer Punkt	pH 6,3
Elektrophoretische Wanderung	β -Globulin
Hitzebeständigkeit	2 h 56°C
Spaltung durch	Mercaptoäthanol MG eines nachweisbaren Spaltproduktes: 105.000
Serumkonzentration	540 μ g/ml

E) DISKUSSION

Der C3b INA wurde 1967 von Tamura und Nelson (114) für Human-, Kaninchen- und Meerschweinenserum erstmals beschrieben und grob charakterisiert. In der Folge wurde der humane C3b INA von einer Reihe von Autoren isoliert, physikochemisch charakterisiert und seine biologischen Eigenschaften beschrieben. Die Ergebnisse wurden in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Die hier vorgelegte Arbeit hatte zum Ziel, den C3b INA aus Meerschweinenserum rein darzustellen, seine physikochemischen Parameter zu bestimmen und in Beziehung zu der Literaturbeschreibung zu setzen.

Das Meerschweinenserum dient neben dem Humanserum als bevorzugte Komplementquelle. Zwischen Meerschweinchen- und Humankomplement besteht eine sehr große Parallelität, und in der Geschichte der Erforschung des Komplementsystems wurden die bahnbrechenden Erkenntnisse wechselweise einmal an dem einen, einmal an dem anderen System gewonnen.

Große Fortschritte machte die Komplementforschung durch die Anwendung neuer biochemischer Arbeitsmethoden, die eine Reindarstellung der einzelnen Faktoren und somit ihre genaue Charakterisierung ermöglichte. Erst die Anwendung reiner Faktoren erlaubt nämlich ein genaues Studium der Einzelkomponenten und ihrer biologischen Aktivitäten.

Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene Reinigungsschema führte zur Isolierung des MS-C3b INA. Die spezifische Wirkung

des gereinigten Präparates auf C3b wurde folgendermaßen geprüft: Nach Inkubation des C3b INA mit EAC 1423b Zellen und nachfolgendem gründlichen Waschen konnten die so behandelten Zellen im Gegensatz zur Pufferkontrolle durch Zugabe der terminalen Komponenten nicht mehr lysiert werden. In dieser Arbeit wurden zum erstenmal die physikochemischen Parameter im Zusammenhang beschrieben. Lediglich eine Angabe der Sedimentationskonstante war in der Literatur angegeben:

Bei dem Meerschweinchen-C3b INA handelt es sich um ein β -Globulin mit einem MG von 140.000, einem isoelektrischen Punkt von pH 6,3 und einer Sedimentationskonstanten von 5,5. Dieser Wert weicht um 0,7 Einheiten von dem bei Tamura und Nelson angegebenen 4,85 ab.

Die hier für den Meerschweinchen-C3b INA angegebenen Werte stimmen sehr gut mit den vorläufigen physikochemischen Parametern für den Maus-C3b INA überein, die in der letzten Zeit parallel zu der Untersuchung des MS-C3b INA bestimmt wurden. Für den Maus-C3b INA wurde eine Sedimentationskonstante von 5,4 - 5,6 S gefunden. Der IP wurde mit 5,8 - 6,1 bestimmt. Auch der Maus-C3b INA wurde bei Gelfiltration auf Sephadex G 200 superfine im IgM Peak eluiert. Eine genaue Angabe des Molekulargewichts kann jedoch noch nicht gegeben werden. Funktionell getestet wurde der Maus-C3b INA in dem vom MS-C3b INA her bekannten Testsystem. Der Maus-C3b INA ist also im Gegensatz zu Maus-C3 im heterologen Testsystem nachweisbar.

Nach der S-Rate war ein Molekulargewicht zwischen 100.000 - 140.000 zu erwarten. Der unter nicht-reduzierenden Bedingungen in der SDS-Elektrophorese gefundene Wert von 140.000 ent-

sprach somit den Erwartungen. Diese Angabe unterscheidet sich um ca. 40.000 D von dem für den humanen C3b INA bestimmten Wert (57).

Bei allen Läufen unter reduzierenden Bedingungen wurde nur eine Bande gefunden, der ein Molekulargewicht von 105.000 zugeordnet werden konnte. Entsprechend der Differenz von 35.000 Dalton zwischen diesem und dem unter nichtreduzierenden Bedingungen gefundenen Wert, waren eine oder mehrere weitere Banden zu erwarten. Sie konnten aber niemals, auch bei Läufen in höher konzentrierten (10 % Acrylamid) Gelen, nachgewiesen werden. Man könnte also annehmen, daß von dem Molekül Bruchstücke von Peptidgröße abgespalten werden, die dem Nachweis entgehen.

Das Verhalten auf Sephadex G 200 superfine und Biogel P 300, wo man nach der von Andrews angegebenen Methode ein Molekulargewicht von 260.000 findet, kann nur durch eine außergewöhnliche Konformation des Moleküls erklärt werden. Eine endgültige Deutung dieses Befundes läßt sich derzeit jedoch noch nicht geben, zumal eine Komplexierung von C3b INA Molekülen miteinander ausgeschlossen wurde, denn auch bei Läufen in Gegenwart von 2 M KCl änderte sich die Position des C3b INA nicht.

Ob eine Parallelität zu dem in neuester Zeit beschriebenen humanen C3b INA-Akzelerator besteht ist fraglich. Dieser neue Faktor soll ein Molekulargewicht von 360.000 Dalton haben und einen isoelektrischen Punkt zwischen pH 5-6 besitzen. Allerdings soll er selbst nicht in der Lage sein, C3b zu spalten, sondern nur die C3b INA-Wirkung potenzieren (122, 123).

Mit der Reindarstellung und der physikochemischen Charakterisierung des C3b INA bietet sich nun die Möglichkeit zur Beantwortung

einer Reihe von Fragen, die jedoch außerhalb des dieser Arbeit gesteckten Rahmens liegen. Naheliegend ist eine anschließende genaue Analyse seiner enzymatischen Eigenschaften. Zum zweiten kann die Bypass-Regulation mittels des C3b INA studiert werden. Das wohl umfangreichste Aufgabenfeld liegt in der Untersuchung der C3b INA-Wirkung auf membran-gebundenes C3b. Bestätigen sich die Annahmen, daß C3b eine modifizierende und steuernde Wirkung auf immunologisch wichtige Zellen, wie z.B. B-Lymphozyten, ausübt, so handelt es sich bei dem C3b INA um ein übergeordnetes Regelenzym, dessen biologische Bedeutung derzeitig noch nicht abzusehen ist.

F) ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Meerschweinchen-C3b INA rein darzustellen und seine physikochemischen Parameter zu bestimmen, um in der Folge mit einem proteinchemisch definierten Protein arbeiten zu können.

Es wurden zwei Wege beschrieben, den C3b INA aus Meerschweinchenserum zu reinigen. Das gewonnene Material war nach den heutigen proteinchemischen Reinheitskriterien homogen. Mit diesem Material wurden die folgenden physikochemischen Parameter bestimmt:

Die Serumkonzentration, bestimmt durch radiale Immundiffusion nach Mancini, beträgt 540 $\mu\text{g/ml}$. Das Protein wandert in der Elektrophorese als β -Globulin.

Das Molekulargewicht des unreduzierten Moleküls beträgt 140.000 D, gefunden durch SDS-Gelelektrophorese.

Durch Reduktion erhält man ein Molekül von 105.000 D. Andere Bruchstücke konnten mit den benutzten Verfahren nicht nachgewiesen werden.

Die Sedimentationskonstante beträgt 5,5 S; der isoelektrische Punkt liegt bei pH 6,3.

Mit dem so definierten Material kann nun die Rolle des C3b INA in der Regulation des Komplementsystems, speziell der Nebenschlußreaktion, untersucht werden.

G) LITERATURVERZEICHNIS

1. Abramson, N., Alper, A.C., Lachmann, P.J., Rosen, F.S., Jandl, J.H.
Deficiency of C3 Inactivator in man.
J.Immunol. 107, 19 (1971)
2. Alper, C.A., Rosen, F.S.
Studies of the in vivo behaviour of human C3 in normal subjects and patients.
J.clin.Invest. 46, 2021 (1967)
3. Alper, C.A., Abramson, N., Johnston, R.B.Jr., Jandl, J.H., Rosen, F.S.
Increased susceptibility to infection associated with abnormalities of complement mediated functions and of the third component of complement.
New Engl.J.Med. 282, 349 (1970)
4. Alper, C.A., Abramson, N., Johnston, R.B.Jr., Jandl, J.H., Rosen, F.S.
Studies in vivo and in vitro on an abnormality in the metabolism of C3 in a patient with increased susceptibility to infection.
J.clin.Invest. 49, 1975 (1970)
5. Alper, C.A., Rosen, F.S.
Genetic aspects of the complement system.
Advanc.Immunol. 14, 252 (1971)
6. Alper, C.A. Rosen, F.S., Lachmann, P.J.
Inactivator of the third component of complement as an inhibitor in the properdin pathway.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 69, 2910 (1972)
7. Andrews, P.
The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range.
Biochem.J. 96, 595 (1965)

8. Axen, R., Porath, I., Ernback, S.
Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides.
Nature 214, 1302 (1967)
9. Becker, E.L.
The relation of complement to other systems.
Proc.Roy.Soc.B. 173, 383 (1969)
10. Bitter-Suermann, D., Hadding, U., Melchert, F., Wellensiek, H.J.
Independent and consecutive action of C5, C6 and C7 in immune hemolysis.
I.Preparation of EAC 1-5 with purified guinea pig C3 and C5.
Immunochem. 7, 955 (1970)
11. Bitter-Suermann, D.
Aktivierung des Komplementsystems - Ein Monopol des Immunkomplexes ?
Klin.Wschr. 50, 277 (1972)
12. Bitter-Suermann, D., Dierich, M., König, W., Hadding, U.
Bypass-Activation of the complement system starting with C3.
I. Generation and function of an enzyme from a factor of guinea pig serum and cobra venom.
Immunology 23, 267 (1972)
13. Bitter-Suermann, D., Hadding, U., Schorlemmer, H.-U., Limbert, M., Dierich, M., Dukor, P.
Activation by some T-independent antigens and B-cell mitogens of the alternative pathway of the complement system.
J.Immunol. 115, No 2, 425-430 (1975)

14. Bokisch, V.A., Müller-Eberhard, H.J., Cochrane, C.G.
Isolation of a fragment (C3a) of a third component of human complement containing anaphylatoxin and chemotactic activity and description of an anaphylatoxin inactivator of human serum.
J.Exp.Med. 129, 1109 (1969)
15. Bokisch, V.A., Dierich, M.P., Müller-Eberhard, H.J.
Third component of complement (C3): structural properties in relation to functions.
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 72, 1989 (1975)
16. Borsos, T., Rapp, H.J.
Complement fixation on cell surfaces by 19S and 7S antibodies.
Science. 150, 505 (1965)
17. Burger, R., Hadding, U., Schorlemmer, H.U., Brade, V., Bitter-Suermann, D.
Dextran Sulphate: a synthetic activator of C3 via the alternative pathway.
I. Influence of molecular size and degree of sulphatation on the activation potency.
Immunology 29, 549 (1975)
18. Coca, A.F.
A study of the anticomplementary action of yeast of certain bacteria and of cobra venom.
Z.Immun.Forsch. 21, 604 (1914)
19. Cochrane, C.G., Müller-Eberhard, H.J.
The derivation of two distinct anaphylatoxin activities from the third and fifth components on human complement.
J.Exp.Med. 127, 371 (1968)

20. Cooper, N.R.
Characterization of the C3 Inactivator of human serum.
J.Immunol. 107, 314 (1971)
21. Cooper, N.R.
Isolation and analysis of the mechanism of action
of an inactivator of C4b in normal human serum.
J.Exp.Med. 141, 890 (1975)
22. Daniels, C.A., Borsos, T., Rapp, H.J., Snyderman, R.,
Notkins, A.L.
Neutralization of sensitized virus by the fourth
component of complement.
Science 165, 508 (1969)
23. Davis, S.D., Wedgewood, R.J.
Kinetics of the bactericidal action of normal
serum on gram-negative bacteria.
J.Immunol. 95, 75 (1965)
24. Dierich, M.P., Bitter-Suermann, D., König, W., Hadding, U.
Formation and function of a complement-activating enzyme
generated from factors of guinea pig serum and cobra venom.
Eur.J.Immunol. 1, 309 (1971)
25. Dierich, M.P., Bitter-Suermann, D., König, W., Hadding, U.,
Galanos, C., Rietschel, E.T.
Analysis of bypass activation of C3 by endotoxic LPS
and loss of his potency.
Immunology 24, 721 (1973)
26. Dierich, M.P., Pellegrino, M.A., Ferrone, S., Reisfeld, R.A.
Evaluation of C3 receptors an lymphoid cells with
different complement sources.
J.Immunol. 112, 1766 (1974)

27. Donaldson, V.H., Evans, R.R.
A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema.
Amer.J.Med. 35, 37 (1963)
28. Dorfner, K.
Ionenaustauscher 3. Aufl.
de Gruyter & Co, Berlin (1970)
29. Dukor, P., Bianco, C., Nussenzweig, V.
Bone marrow origin of complement-receptor lymphocytes.
Eur.J.Immunol. 1, 491-494 (1971)
30. Dukor, P., Dietrich, F.M., Gisler, R.H., Schumann, G.,
Bitter-Suermann, D.
Possible targets of complement action in B-cell triggering.
Prog.Immunol. II, 3, 99 (1974)
31. Flexner, S., Noguchi, H.
Snake venom in relation to haemolysis,
bacteriolysis and toxicity.
J.Exp.Med. 6, 277 (1903)
32. Fraenkel-Conrat, H.
Methods for investigating the essential groups
for enzyme activity.
in: Methods in Enzymology, Vol. VI, 247
Academic Press Inc, Publishers, N.Y. (1957)
33. Frimmer, M.
Biochemie und Pathophysiologie von Entzündungsmediatoren.
Int.Z.Klin.Pharmakol.Ther.Toxikol. 5, 144 (1971)
34. Gigli, I., Mason, J.W., Colmen, R.W., Austen, K.F.
Interaction of kallikrein with the C1-esterase inhibitor.
J.Immunol. 101, 814 (1968)

35. Gigli, I.
Control mechanisms of the classical and alternate complement sequences
from: the immunobiology of complement.
Transplant.Proc. VI, 1, 9 (1974)
36. Gitlin, J.D., Rosen, F.S., Lachmann, P.J.
The mechanism of action of the C3b (Conglutinogen-Activating Factor) on its naturally occurring substrate, the major fragment of the third component of complement (C3b).
J. of exp. Med. 141, 1221-1226 (1975)
37. Glynn, A.A.
The complement lysozyme sequence in immune bacteriolysis.
Immunology 16, 463 (1969)
38. Götze, O., Müller-Eberhard, H.J.
Lysis of erythrocytes by complement in absence of antibody.
J.Exp.Med. 132, 898 (1970)
39. Götze, O., Müller-Eberhard, H.J.
Mechanism of lysis of non-sensitized cells by complement.
Fed.Proc. 28, 818 (1969)
40. Götze, O., Müller-Eberhard, H.J.
The C3-activator system: an alternate pathway of complement activation.
J.Exp.Med. 134, Suppl. 90 s (1971)
41. Hadding, U., Bitter-Suermann, D.U., Wellensiek, H.J.
Independent and consecutive action of C5, C6 and C7 in immune hemolysis.
II. Formation and decay of the intermediate complexes EAC 1 - 5 and EAC 1 - 6.
Immunochemistry 7, 967 (1970)

42. Hadding, U.

Das Komplement: Vermittlungssystem für humorale
Abwehrleistung und allergische Entzündung.
Der Hautarzt 23, 1-8 (1972)

43. Hadding, U., Dierich, M., König, W., Limbert, M.,
Schorlemmer, H.U., Bitter-Suermann, D.U.

Ability of the T cell-replacing polyanion dextran-
sulfate to trigger the alternative pathway of
complement activation.
Europ.J.Immunol. 3, 527 (1973)

44. Hadding, U., Bitter-Suermann, D.U.

Das Komplementsystem und seine Funktion.
Deutsches Ärzteblatt 13, 932-938 (1974)

45. Hadding, U.

Das Komplementsystem: Biochemie und Funktion.
Documenta Geigy, Folia rheumatologica (1975)

46. Hartmann, K.U., Bokisch, V.A.

Stimulation of murine B-lymphocytes by isolated C3b.
J.Exp.Med. 142, 600 (1975)

47. Hirsch, J.G., Strauß, B.

Studies on heat-labile opsonin in rabbit serum.
J.Immunol. 92, 145 (1964)

48. Hoffmann, E.M.

Inhibition of complement by a substance isolated from
human erythrocytes.
I. Extraction from human erythrocyte stromata.
Immunochemistry 6, 391 (1969 a)

49. Hoffmann, E.M.

Inhibition of complement by a substance isolated from
human erythrocytes.
II. Studies on the site and mechanism of action.
Immunochemistry 6, 405 (1969 b)

50. Jensen, J.A.
A specific inactivator of mammalian C4 isolated from
nurse shark (*ginglymostoma cirratum*) serum.
J.Exp.Med. 130, 217 (1969 a)
51. Kabat, E.A., Mayer, M.M.
Experimental Immunochemistry, second edition
Charles c. Thomas Publisher
Springfield - Illinois, USA (1971)
52. Kagen, L.J., Becker, E.
Inhibition of permeability globulins by C1-esterase
inhibitor.
Fed.Proc. 22, 613 (1963)
53. Klein, P.G., Wellensiek, H.J.
Multiple nature of the third component of guinea pig
complement.
I. Separation and characterization of three factors
a, b, and c, essential for haemolysis.
Immunology 8, 590 (1965)
54. König, W., Bitter-Suermann, D.U., Dierich, M., Hadding, U.
Physicochemical characterization of the fifth (C5)
sixth (C6), seventh (C7), eighth (C8) and ninth (C9)
component of guinea pig complement.
Eur.J.Immunol. 1, 372 (1971)
55. König, W., Bitter-Suermann, D., Dierich, M., Hadding, U.
Bypass-Activation of the complement system starting
with C3.
II. C3-Activation by Gamma-Immune-Aggregates in
Guinea Pig Serum.
Immunochemistry 10, 431-437 (1973)

56. Kolb, W.P., Haxby, J.A., Arroyave, C.M., Müller-Eberhard, H.J.
Molekular analysis of the membrane attack mechanism
of complement.
J.Exp.Med. 135, 549 (1972)
- 56a. Kolb, W.P., Müller-Eberhard, H.J.
The membrane attack mechanism of complement.
Isolation and subunit composition of the C5b-9 complex.
J.Exp.Med. 141, 724 (1975)
57. Lachmann, P., Müller-Eberhard, H.J.
The demonstration in human serum of "conglutininogen-
activating factor" and its effect on the third compo-
nent of complement.
J.Immunol. 100, 691 (1968)
58. Lachmann, P., Thompson, R.A.
Reactive lysis: The complement-mediated lysis of
unsensitized cells.
II. The characterization of activated reactor as
C5b and the participation of C8 and C9.
J.Exp.Med. 131, 643 (1970)
59. Lachmann, P.J., Aston, W.P., Nicol, P.
Further studies on the C3b inactivator or congluti-
nogen activating factor (KAF).
Immunochemistry 10, 695 (1973)
60. Lachmann, P., Halbwachs, L.
The influence of C3b-Inactivator (KAF) concentration
on the ability of serum to support complement activation.
Clin.exp.Immunol. 21, 109-114 (1975)
61. Leon, M.A., Lepow, I.H.
Interaction of a serum inhibitor of C'1-esterase with
intermediate complexes of the immune haemolytic system.
II. Kinetics and mechanism of the interaction.
Immunology 5, 235 (1962)

62. Lichtenstern, L.M., Gewurz, H., Adkinson, N.F.,
Shin, H.S., Mergenhagen, S.E.
Interactions of complement system with endotoxic
lipopolysaccharide: the generation of an anaphylatoxin.
Immunology 16, 327 (1969)
63. Limbert, M.
Isolierung und antigenetische Charakterisierung
der dritten Komplementkomponente (C3) aus Meer-
schweinchenserum.
Nachweis von Spaltprodukten und deren biologische
Bedeutung.
Dissertation, Darmstadt 1975
64. Linscott, W., Nishioka, Kusuya
Compounds of guinea pig complement.
II. Separation of serum fractions essential for
immune haemolysis.
J.Exp.Med. 118, 795 (1963)
65. Loos, M., Wagner, H., Opferkuch, W.
Guinea pig C1a inactivator:
Purifikation and characterization. "
Prot.Biol.Fluids 17, 311 (1969)
66. Loos, M., Opferkuch, W.
Die Wirkungsweise des C1-esterase Inhibitors.
Allergie- u. Immunitätsforsch. Vol III, 253 (1970)
67. Loos, M., Opferkuch, W., Ringelmann, R.
Studien über den C1-Inaktivator des Meerschweinchen-
komplements: Meßmethode, Reinigung und Charakteri-
sierung des Proteins.
Z.med.Mikrobiol. u. Immunol. 156, 194 (1971)

68. Loos, M., Opferkuch, W., Wagner, H.
Wirkungsspektrum des C1-Inaktivators aus Meer-
schweinchenserum.
I. Wirkung auf ungebundenes C1.
Z.med.Mikrobiol. u. Immunol. 156, 208 (1971)
69. Loos, M.
Wirkungsspektrum des C1-Inaktivators aus Meer-
schweinchenserum.
II. Wirkung auf gebundenes C1.
Z.med.Mikrobiol. u. Immunol. 156, 221 (1971)
70. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J.Biol.Chem. 193, 265 (1951)
71. Maurer, H.R.
Disc Electrophoresis and Related Techniques of Poly-
acrylamid Gel Electrophoresis 2. Aufl.
de Gruyter Berlin - New York (1971)
72. Medicus, R.G., Götze, O., Müller-Eberhard, H.J.
C3b-Inactivator: The Properdin receptor destroying enzyme.
Fed.Proc. 35, 654 (1976)
73. Medicus, R.G., Schreiber, R.D., Götze, O., Müller-Eberhard, H.J.
A molecular concept of the properdin pathway.
Proc.Nat.Acad.Sci. 73, 612 (1976)
74. Mergenhagen, S.E., Snyderman, R., Gewurz, H., Shin, H.S.
Significance of complement to the mechanism of action
of endotoxin.
in: Current topics in microbiology and immunology
50, 49 (1969) Springer, Berlin-Heidelberg-New York
75. Möller, G., Coutinho, A.
Role of C'3 and Fc-receptors in B-lymphocyte activation.
J.Exp.Med. 141, 647 (1975)

76. Müller-Eberhard, H.J., Dalmasso, A.P., Calcott, M.A.
The reaction mechanism of B1c-globulin (C3) in
immune haemolysis.
J.Exp.Med. 123, 33 (1966)
77. Müller-Eberhard, H.J., Polley, M.J., Calcott, M.A.
Formation and functional significance of a molecular
complex derived from the second and the fourth
component of human complement.
J.Exp.Med. 125, 359 (1967)
78. Müller-Eberhard, H.J.
Complement.
in: Brent, L., Holborow, J., (Hg.)
Progress in Immunology II, Bd. 1,
North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1974 S. 173
79. Nelson, R.A.
The immune-adherence phenomenon.
An immunologically specific reaction between micro-
organismen and erythrocytes leading to enhanced phagocytosis
Science 118, 733 (1953)
80. Nelson, R.A., Jenson, J., Gigli, I., Tamura, N.
Methods for the separation, purification and
measurement of nine components of hemolytic complement
in guinea pig serum.
Immunochemistry 3, 111 (1966)
81. Nelson, R.A.
Immun-adherence.
in: 2nd Intern. Symp. Immunopath.
Eds P. Grabar and P. Miescher, Basel - Stuttgart
Schwabe (1962)

82. Nicholson, A., Brade, V., Schorlemmer, H.U.,
Burger, R., Bitter-Suermann, D., Hadding, U.
Interaction of C3b, B and D in the alternative
pathway of complement activation.
J.Immunol. 115, No. 4, 1108-1113 (1975)
83. Nicol, P.A.E., Lachmann, P.J.
The Alternate Pathway of Complement Activation.
The role of C3 and its inactivator (KAF).
Immunol. 24, 259 (1973)
84. Nilsson, U., Müller-Eberhard, H.J.
Requirement of C3, C5, C6 and C7 for the formation
of a thermostable intermediate complex between
sheep erythrocytes and human complement.
Immunochemistry 3, 500 (1966)
85. Nilsson, U., Müller-Eberhard, H.J.
Studies on the mode of action of the fifth, sixth
and seventh component of human complement in
immune hemolysis.
Immunology 13, 101 (1967)
86. Nishioka, K., Linscott, William D.
Components of guinea pig complement.
I. Separation of a serum fraction essential for
immune hemolysis and immune adherence.
J.Exp.Med. 118, 767 (1963)
87. Nomenclature of Complement
Bull. Wld. Hlth. Org. 39, 935-938 (1968)
88. Opferkuch, W., Loos, M., Borsos, T.
Isolation and characterization of a factor from
human and guinea pig serum that accelerates the
decay of SAC 142.
J.Immunol. 107, 313 (1971)

89. Cuchterlony, Ü.
Gel diffusion techniques.
in: Ackrodt, I.F. (Hrsg.): Immunological Methods
Blackwell Scientific Publ., Oxford 1964
90. Pensky, J., Levy, L.R., Lepow, I.H.
Partial purification of a serum inhibitor of C1-
esterase.
J.biol.Chem. 236, 1474 (1961)
91. Pillemer, L., Blum, L., Lepow, I.H., Ross, O.A.,
Todd, E.W., Wardlaw, A.C.
The properdin system and immunity:
I. Demonstration and isolation of a new serum protein
properdin, and its role in immune phenomena.
Science 120, 279 (1954)
92. Pillemer, L., Schoenberg, M.D., Blum, L., Wurz, L.
Properdin system and immunity:
II. Interaction of the properdin system with
polysaccharides.
Science 122, 545 (1955)
93. Radola, B.J.
Analytical and preparative isoelectric fokussing
of proteins in Sephadex and Biogel layers.
Protides.Biol.Fluids.Proc.Colloq. 18, 487 (1971)
94. Ratnoff, O.D., Lepow, I.H.
Some properties of an esterase derived from
preparations of the first component of complement.
J.Exp.Med. 106, 327 (1957)
95. Ratnoff, O.D., Pensky, J., Oquton, D., Naff, G.B.
The inhibition of plasmin, plasma kallikrein, plasma
permeability factor, and the C1r subcomponent of the
first component of complement by serum C1-esterase
inhibitor.
J.Exp.Med. 129, 315 (1969)

96. Ritz, H.
Über die Wirkung des Cobragiftes auf die Complemente.
Z.Immun.Forsch. 13, 66 (1912)
97. Ross, G.D., Polley, M.J., Rabellino, E.M., Grey, H.M.
Two different complement receptors on human
lymphocytes.
One specific for C3b and one specific for C3b
Inactivator-Cleaves C3b.
J.Exp.Med. 138, 798 (1973)
98. Ringelmann, R., Opferkuch, W., Röllinghoff, M., Loos, M.
Komplementmessung mit Hilfe des Mikrolitersystems.
Z.med.Mikrobiol. u. Immunol. 154, 329 (1969)
99. Rother, K.
Leucocyte mobilizing factor. A new biological
activity derived from the third component of
complement.
Europ.J.Immunol. 2, 550 (1972)
100. Rother, K., Hadding, U., Till, G.
Komplement Biochemie und Pathologie.
Dr.Dietrich Sternkopff Verlag, Darmstadt (1974)
101. Ruddy, S., Austen, K.F.
C3b-Inactivator of man.
I. Hemolytic measurement of inactivation of cell-bound C3.
J.Immunol. 102, 533, (1969)
102. Ruddy, S., Austen, K.F.
Degradation of C3b by the C3b-Inactivator.
J.Immunol. 107, 313 (1971)
103. Ruddy, S., Austen, K.F.
C3b-Inactivator of man.
II. Fragments produced by C3b-Inactivator Cleavage
of cell-bound or Fluid Phase C3b.
J.Immunol. 107, 742 (1971)

104. Ruddy, S., Munsicker, I.G., Austen, K.F.
C3b-Inactivator of man.
III. Further Purification and Production of antibody
to C3b INA.
J.Immunol. 108, 657 (1972)
105. Ruddy, S.
Chemistry and biologic activity of the complement system.
The immunobiology of complement.
Transplant.Proc. Vol. VI, No 1 (1974)
106. Sandberg, A.L., Wahl, S.M., Mergenhagen, S.E.
Lymphokine production by C3b stimulated B-cells.
J.Immunol. 115, 139 (1975)
107. Scheidegger, J.J.
Une microméthode L'immunoélectrophorese.
Intern.Arch.Allerg.Appl.Immunol. 7, 103 (1955)
108. Shin, H.S., Mayer, M.M.
The third component of the guinea pig complement system.
I. Purification and Characterization.
Biochemistry 7, 2991 (1968)
109. Shin, H.S., Smith, M.R., Wood, W.B.
Heat labile opsonins to pneumococcus.
II. Involvement of C3 and C5.
J.Exp.Med. 130, 1229 (1969)
110. Schorlemmer, H.U.
Das Cobragift - Cofaktorensystem des Meerschweinchens,
Reinigung der Cofaktoren aus Serum und ihre Rolle bei
der Nebenschlußaktivierung des Complementsystems.
Dissertation, Darmstadt 1975
111. Schorlemmer, H.U., Davies, P., Allison, A.C.
The ability of activated complement components to
induce lysosomal enzyme release from makrophages.
Nature 261, 48 (1976)

112. Schreiber, R.D., Medicus, R.G., Müller-Eberhard, H.J.
Properdin- and nephritic factor-dependent C3
convertases: requirement of native C3 for enzyme
formation and the function of bound C3b as pro-
perdin receptor.
J.Exp.Med. 142, 760 (1975)
113. Schultz, D.R., Arnold, P.J.
Human C3b-Inactivator (C3b INA): A new Purification
Method and Studies with the Highly Purified Protein
Abstract.
Sarasota meeting of complement 1976
114. Tamura, N., Nelson, R. jr.
Three naturally-occurring inhibitors of components
of complement in guinea pig and rabbit serum.
J.Immunol. 99, 582 (1967)
115. Theofilopoulos, A.N., Bokisch, V.A., Dixon, F.J.
Receptor for soluble C3 and C3b on human lympho-
blastoid (Raji) cells.
J.Exp.Med. 139, 696 (1974)
116. Torisu, M., Sonozaki, H., Shiraishi, S., Nishioka, K.
Purification of C3-Inactivator from human serum.
Nature 218, 1163 (1968)
117. Torisu, M., Nagaki, K., Inai, S., Sonozaki, H.
C4 inactivating factor in C4 deficient human serum.
J.Immunol. 107, 312 (1971)
118. Vogt, W.
Activation; activities and pharmacologically active
products of complement.
Pharmacol.Rev. 26, 125 (1974)

119. Wahl, S.M., Iverson, G.M., Oppenheim, J.J.
Induction of guinea pig B-cell lymphokine synthesis by mitogenic and non mitogenic signals to Fc,Ig and C3 receptors.
J.Exp.Med. 140, 1631 (1974)
120. Weber, K., Osborn, M.
The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
J.Biol.Chem. 244, No 16, 4406 (1969)
121. Wellensiek, H.J., Klein, P.G.
Multiple nature of the third component of guinea pig complement.
II. Separation and description of two additional factors B and d; preparation and characterization of four intermediate products.
Immunology 8, 604 (1965)
122. Whaley, K., Ruddy, S.
C3b INA Accelerator: a serum cofactor for C3b-Inactivator necessary for the full expression of its activity.
Sarasota meeting of complement 1976.
123. Whaley, K. Ruddy, S.
C3b-Inactivator Accelerator (A C3b INA): a serum protein of the complement system required for full expression of C3b-Inactivator (C3b INA) activity.
Fed.Proc. 35, 654 (1976)
124. Winkelstein, I.A., Bocchini, I.A., Schiffmann, G.
The role of the capsular polysaccharide in the activation of activation of the alternative pathway by the pneumococcus.
J.Immunol. 116, 367 (1976)
125. Wuepper, K.D., Bokisch, V.A., Müller-Eberhard, H.J., Stoughton, R.B.
Cutaneous response to human C3 anaphylatoxin in man.
Clin,Exp.Immunol. 11, 13 (1972)

Ich danke Herrn Prof. Dr. D. Bitter-Suermann und Herrn Prof.
Dr. U. Hadding für die gründliche Unterweisung, die die Aus-
führung dieser Arbeit ermöglichte.

Lebenslauf

Am 11. 10. 1948 wurde ich, Ulf Göbel, als Sohn des Geschäftsführers Franz Göbel und seiner Ehefrau Margarete Göbel, geb. Sachs, in Koblenz-Horchheim geboren.

Von 1955-1959 besuchte ich die katholische Volksschule in Koblenz-Asterstein, anschließend von 1959-1968 das altsprachliche staatliche Görresgymnasium in Koblenz. Dort legte ich im Juni 1968 mein Abitur ab.

Im WS 1968/69 begann ich an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz ein Biologiestudium. Das Vordiplom in diesem Fach legte ich im Oktober 1970 ab. Das Diplom mit dem Hauptfach Mikrobiologie möchte ich nach Erhalt meiner Approbation ablegen.

Das Studium der Humanmedizin begann ich im WS 1969/70 an der obengenannten Universität. Im Oktober 1970 bestand ich die naturwissenschaftliche und im März 1972 die ärztliche Vorprüfung. Nach dreimonatiger Famulatur im St. Josef-Krankenhaus in Koblenz und dem Centre Hospitalier in Agen/Frankreich legte ich im Juli 1975 mein medizinisches Staatsexamen ab.

Von August 1975 bis Februar 1976 war ich als Medizinalassistent im Institut für Medizinische Mikrobiologie tätig. Zur Zeit , arbeite ich ebenfalls als Medizinalassistent in der II. Med. Universitätsklinik in Mainz.

Seit dem SS 1973 bin ich Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes.

Die vorliegende Dissertation mit dem Titel "Reinigung und physikochemische Charakterisierung des C3b-Inaktivators (C3b INA) aus Meerschweinchenserum" wurde von September 1972 bis Februar 1976 im Institut für Med. Mikrobiologie in Mainz (Direktor: Prof.Dr.P.Klein) unter Anleitung der Professoren Hadding und Bitter-Suermann durchgeführt.

